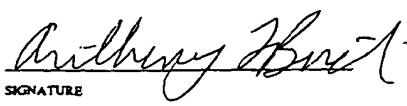


BB

65 Rec'd PCT/PT 07 MAR 1994

FORM PTO-1390 (REV 5-93)		U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE PATENT AND TRADEMARK OFFICE	ATTORNEY'S DOCKET NUMBER 760-180PCT
TRANSMITTAL LETTER TO THE UNITED STATES DESIGNATED/ELECTED OFFICE (DO/EO/US) CONCERNING A FILING UNDER 35 U.S.C. 371			U.S. APPLICATION NO. (PCT/PT/US) 08/193058
INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/JP93/00925	INTERNATIONAL FILING DATE 6 July 1993	PRIORITY DATE CLAIMED 7 July 1992	
TITLE OF INVENTION METHOD FOR TRANSFORMING MONOCOTYLEDONS			
APPLICANT(S) FOR DO/EO/US HIEI, Yukoh & KOMARI, Toshihiko			
Applicant herewith submits to the United States Designated/Elected Office (DO/EO/US) the following items and other information:			
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> This is a <b>FIRST</b> submission of items concerning a filing under 35 U.S.C. 371.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> This is a <b>SECOND</b> or <b>SUBSEQUENT</b> submission of items concerning a filing under 35 U.S.C. 371.</li> <li>3. <input checked="" type="checkbox"/> This express request to begin national examination procedures (35 U.S.C. 371(f)) at any time rather than delay examination until the expiration of the applicable time limit set in 35 U.S.C. 371(b) and PCT Articles 22 and 39(1).</li> <li>4. <input type="checkbox"/> A proper Demand for International Preliminary Examination was made by the 19th month from the earliest claimed priority date.</li> <li>5. <input checked="" type="checkbox"/> A copy of the International Application as filed (35 U.S.C. 371(c)(2)) <ol style="list-style-type: none"> <li>a. <input type="checkbox"/> is transmitted herewith (required only if not transmitted by the International Bureau).</li> <li>b. <input checked="" type="checkbox"/> has been transmitted by the International Bureau.</li> <li>c. <input type="checkbox"/> is not required, as the application was filed in the United States Receiving Office (RO/US)</li> </ol> </li> <li>6. <input type="checkbox"/> A translation of the International Application into English (35 U.S.C. 371(c)(2)).</li> <li>7. <input type="checkbox"/> Amendments to the claims of the International Application under PCT Article 19 (35 U.S.C. 371(c)(3)) <ol style="list-style-type: none"> <li>a. <input type="checkbox"/> are transmitted herewith (required only if not transmitted by the International Bureau).</li> <li>b. <input type="checkbox"/> have been transmitted by the International Bureau.</li> <li>c. <input type="checkbox"/> have not been made; however, the time limit for making such amendments has NOT expired.</li> <li>d. <input type="checkbox"/> have not been made and will not be made.</li> </ol> </li> <li>8. <input type="checkbox"/> A translation of the amendments to the claims under PCT Article 19 (35 U.S.C. 371(c)(3)).</li> <li>9. <input type="checkbox"/> An oath or declaration of the inventor(s) (35 U.S.C. 371(c)(4)).</li> <li>10. <input type="checkbox"/> A translation of the annexes to the International Preliminary Examination Report under PCT Article 36 (35 U.S.C. 371(c)(5)).</li> </ol>			
Items 11. to 16. below concern other document(s) or information included:			
<ol style="list-style-type: none"> <li>11. <input type="checkbox"/> An Information Disclosure Statement under 37 CFR 1.97 and 1.98.</li> <li>12. <input type="checkbox"/> An assignment document for recording. A separate cover sheet in compliance with 37 CFR 3.28 and 3.31 is included.</li> <li>13. <input type="checkbox"/> A FIRST preliminary amendment. <input type="checkbox"/> A SECOND or SUBSEQUENT preliminary amendment.</li> <li>14. <input type="checkbox"/> A substitute specification.</li> <li>15. <input type="checkbox"/> A change of power of attorney and/or address letter.</li> <li>16. <input type="checkbox"/> Other items or information:</li> </ol>			

U.S. APPLICATION NO. 151200000, see 37 C.F.R. 1.50		INTERNATIONAL APPLICATION NO. <b>PCT/JP93/00925</b>		ATTORNEY'S DOCKET NUMBER <b>760-180PCT</b>	
17. <input checked="" type="checkbox"/> The following fees are submitted: <b>Basic National Fee (37 CFR 1.492(a)(1)-(5)):</b> Search Report has been prepared by the EPO or JPO..... \$830.00  International preliminary examination fee paid to USPTO (37 CFR 1.482) ..... \$640.00 No international preliminary examination fee paid to USPTO (37 CFR 1.482) but international search fee paid to USPTO (37 CFR 1.445(a)(2)).. \$710.00  Neither international preliminary examination fee (37 CFR 1.482) nor international search fee (37 CFR 1.445(a)(2)) paid to USPTO..... \$950.00  International preliminary examination fee paid to USPTO (37 CFR 1.482) and all claims satisfied provisions of PCT Article 33(2)-(4)..... \$90.00  <b>ENTER APPROPRIATE BASIC FEE AMOUNT =</b>				<b>CALCULATIONS</b> <small>PTO USE ONLY</small>  <div style="font-size: 2em; margin: 20px 0;">950.00</div>	
Surcharge of \$130.00 for furnishing the oath or declaration later than <input checked="" type="checkbox"/> 20 <input type="checkbox"/> 30 months from the earliest claimed priority date (37 CFR 1.492(e)).				\$ 130.00	
Claims	Number Filed	Number Extra	Rate		
Total Claims	- 20 -		X \$22.00		
Independent Claims	- 3 -		X \$74.00		
Multiple dependent claims(s) (if applicable)			+ \$230.00		
<b>TOTAL OF ABOVE CALCULATIONS</b>				<b>= \$ 1,080.00</b>	
Reduction by 1/2 for filing by small entity, if applicable. Verified Small Entity statement must also be filed. (Note 37 CFR 1.9, 1.27, 1.28).					
<b>SUBTOTAL</b>				<b>= \$</b>	
Processing fee of \$130.00 for furnishing the English translation later than <input checked="" type="checkbox"/> 20 <input type="checkbox"/> 30 months from the earliest claimed priority date (37 CFR 1.492(f)).				+ \$ 130.00	
<b>TOTAL NATIONAL FEE</b>				<b>= \$ 1,210.00</b>	
Fee for recording the enclosed assignment (37 CFR 1.21(h)). The assignment must be accompanied by an appropriate cover sheet (37 CFR 3.28, 3.31). \$40.00 per property +					
<b>TOTAL FEES ENCLOSED</b>				<b>= \$ 1,210.00</b>	
				Amount to be: refunded \$ charged \$	
a. <input checked="" type="checkbox"/> A check in the amount of <u>\$1,210.00</u> to cover the above fees is enclosed.  b. <input type="checkbox"/> Please charge my Deposit Account No. _____ in the amount of \$ _____ to cover the above fees. A duplicate copy of this sheet is enclosed.  c. <input checked="" type="checkbox"/> The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required, or credit any overpayment to Deposit Account No. <u>02-2448</u> . A duplicate copy of this sheet is enclosed.					
NOTE: Where an appropriate time limit under 37 CFR 1.494 or 1.495 has not been met, a petition to revive (37 CFR 1.137(a) or (b)) must be filed and granted to restore the application to pending status.					
SEND ALL CORRESPONDENCE TO:  BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH P.O. Box 747 Falls Church, VA 22040-0747				<div style="font-size: 1.5em; margin: 0;">  </div> SIGNATURE <b>Anthony L. BIRCH</b> NAME <u>26,122</u> REGISTRATION NUMBER	
March 7, 1994					

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP93/00925

29.07.93

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1992年 7月 7日

REC'D 01 OCT 1993

WIPO PCT

出 願 番 号  
Application Number:

平成 4年特許願第204464号

出 願 人  
Applicant(s):

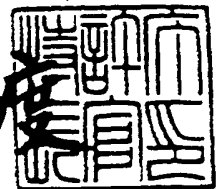
日本たばこ産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1993年 9月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

麻 生 渡



出証番号 出証特平05-3006451

特平 4-204464

【書類名】 特許願

【整理番号】 92229

【提出日】 平成 4年 7月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 単子葉植物の形質転換方法

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社  
社遺伝育種研究所内

【氏名】 樋江井 祐弘

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社  
社遺伝育種研究所内

【氏名】 小鞠 敏彦

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【郵便番号】 140

【住所又は居所】 東京都品川区東品川四丁目12番62号

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代表者】 水野 繁

【電話番号】 03(3474)3111

【代理人】

【識別番号】 100088546

【郵便番号】 102

【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階  
谷川国際特許事務所内

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法（PEG法）、パーティクルガン法その他が知られている。

【0003】

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し、形質転換を図る方法である。現在、最も再現性のある手法で、この方法で種々の遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている（Toriyama K. et al., 1988; Biotech. 6:1072-1074, Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338:274-276, Rhodes C. A. et al., 1989; Science 240:204-207）。しかしながら、この方法は、1) プロトプラストからの個体再生系が確立されている植物種にのみ適用可能である、2) プロトプラストから個体再生までには数か月を要するので、形質転換体を得るのに時間がかかる、3) 培養期間が長期化するもので、それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常な形質転換体を得る確率が低くなる、という問題点を有する。

【0004】

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激がPEGに変わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはいくぶん低いと考えられる。この方法で形質転換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様な問題点を持つ（Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76:835-840, Datta S.K. et al., 1990; Biotech. 8:736-740）。

【0005】

パーティクルガン法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打ち込むことによって形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行うことができ、特に、プロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効である。形質転換効率は、遺伝子を打ち込んだ後の選抜に依存する。エレクトロポレーション法と効率を比較したデータはない（Gordon-Kamm W. J. et al., 1990; Plant Cell

2:603-618, Fromm M.E. et al., 1990; Biotech, 8:833-839, Christou P. et al., 1991; Biotech. 9:957-962)。

【0006】

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養(Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139, Ledoux L. et al., 1974 Nature 249:17-21)、2) 花粉管への処理 (Luo and Wu 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165-)、3) リボソーム法 (Caboche M. 1990; Physiol. Plant. 79:173-176, Gad A. E. et al., 1990:177-183)及び4) マイクロインジェクション法 (Neuhaus G. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36)があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言い難い。

【0007】

一方、アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ベチュニア、ナタネ等の双子葉作物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないとされている (De Cleene M. 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

【0008】

アグロバクテリウムによる単子葉植物の形質転換に関してはアスバラガス (Bytner B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA:84:5345-5349)、そしてヤム (*Dioscorea bulbifera*) (Schaferw, et al., 1987; Nature 327:529-532)で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科作物にはこの方法を適用できないとされている (Potrykus I. 1990; Biotechnology 8:535-543)。

【0009】

Grimsley et al., 1987: Nature 325:177-179はアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシストリークウイルス (Maize streak virus) のDNAを挿入したものをトウモロコシの生長点に接種したところ、トウモロコシストリークウイルスの感染を確認したことを報告している。トウモロコシストリークウイルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認められないことから、上の観察結果はアグロバクテリウムがトウモロコシにDNAを導入することができ

ることを示すものと解釈している。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれなくても増殖する可能性があるので、この結果はT-DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種した時が最も高く (Grimsley et al., 1988; Biotech. 6:185-189)、感染にはアグロバクテリウムのプラスミドのvirC遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et al., Mol. Gen. Genet. 217:309-316)。

【0010】

Gould J. et al, (1991; Plant Physiol. 95:426-434) はトウモロコシの生長点に針で傷をつけた後カナマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を持った強病原性アグロバクテリウムEHA1を接種し、処理後の生長点をカナマイシンで選抜したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子の一部は導入した遺伝子を持つことをサザン分析で確認した (キメラ現象)。

【0011】

Mooney P.A. et al., (1991) Plant Cell, Tissue, Organ Culture 25:209-218 は、アグロバクテリウムを用いて小麦の胚にカナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試みた。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカナマイシン抵抗性と思われるカルスが増殖したが、このカルスからの植物体の再生はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルスで導入遺伝子の構造変異が見られた。

【0012】

Raineri et al, 1990; Biotech. 8:33-38 はイネの胚盤に傷をつけた後、強病原性のアグロバクテリウムA281 (pTiBo542) をイネの8品種に処理したところ、日本晴、藤坂5号の2品種で腫瘍状の組織の増殖が見られた。さらに、T-DNAからホルモン合成遺伝子を除いたTiプラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増殖が見られた。この抵抗性カルスではGUS遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNAがイネ細胞に導入さ

れたと解釈している。

【0013】

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能であることを示唆する研究報告が現れてきているが、まだ、再現性、導入効率、さらには遺伝子の導入の確認についても完全に説得できる結果を示しているとは言い難い (Potrykus I. 1990; Biotech. 8:535-543)。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法が主流であるが、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を要し、多大な労力がかかり、また長期間の培養により高頻度で変異体が出現するという危険性がある。また、この方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、生長点組織を用いることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。しかし、生長点を単離する作業は多くの労力を要し、大量に調製することは必ずしも容易ではない。

【0015】

従って、本発明の目的は、従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

【0016】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子葉の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバイナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の培養組織をアグロバクテリウム属細菌を用いて飛躍的に高い効率で再現性をもって形質転換することができることを見出し、これによれば上記目的を達成することができることを見出し、本発明



を完成した。

【0017】

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供する。

【0018】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。

【0020】

また、本発明の方法に供される培養組織は、いかなる部位由来のものであってもよく、例えば、胚盤、茎頂、幼根、花粉及び蒴由来のものを挙げることができる。培養組織としてはカルスが好ましい。カルスの誘導は、各植物について従来より公知の方法により行うことができる。もっとも、培養組織は必ずしもカルスである必要はなく、懸濁細胞であってもよい。

【0021】

形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くは Agrobacterium tumefaciens 由来の Ti プラスミドのヴィルレンス領域 (vir 領域) 由来の DNA 領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入されるか又はこのベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組換え等により Ti プラスミド中に in vivo で挿入されるものである。また、本願発明者らは、先に、Agrobacterium tumefaciens A281 という強病原性の、形質転換効率が極めて高い株 (フッドら、Bio/Technol、2:702-709、1984年、フッドら、J. Bacteriol.、168:1283-1209、1986年、コマリら、J. Bacteriol.、166:88-94、1986年、ジンら、J. Bacteriol.、169:4417-4425、1987年、コマリ、Plant Science、60:223-229、198

9年、ATCC37349)に含まれるTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域(vir領域)由来のDNA領域を含むベクター(本明細書において、このベクターを「スーパーバイナリーベクター」と呼ぶことがある)を開発した(特願平2-411681号)。このようなスーパーバイナリーベクターを本発明において好ましく用いることができる。

【0022】

このようなスーパーバイナリーベクターの例としてpTOK162を挙げることができる。その構造を図1に示す。このプラスミドは、大腸菌及びAgrobacterium tumefaciens中で増殖可能であるpTOK154と呼ばれるプラスミド(Tiプラスミドから誘導された公知のpGA472プラスミドとpVCK101と呼ばれる公知の広宿主域プラスミドから後述の方法により構築された、T領域を含むプラスミド)にpTiBo542のヴィルレンス領域由来の既にクローン化されていた上記15.2キロベースのKpnI断片(virB、virG、virC各遺伝子を含む)を組み込んだものである。このpTOK154には、T領域の2つの境界配列とその間に単子葉植物に導入しようとする遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、この例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子がpTiBo542のヴィルレンス領域由来のクローン化されたDNA断片を含有するプラスミド上に配置されている例である。

【0023】

単子葉植物に組み込もうとする所望の遺伝子は、上記プラスミドのT領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、プラスミドが有する薬剤耐性等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。もっとも、図1に示すpTOK162のように、大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望のDNAをT領域内に導入することが必ずしも容易ではないことがある。このような場合には、Agrobacterium tumefaciens細胞内のin vivo系での相同組換え(ヘレラーエステレラら、EMBO J.2:987-995, 1983年、ホーチら、Science, 223:496-498, 1984年)を利用することにより、目的のDNAをpTOK162に導入することが可能になる。すなわち、例えば、まず、pTOK162をAgrobacterium tumefaciensに導入しておいて、この菌にさらに所望DNAを導入したpBR322と呼ばれるプラスミド(類似のプラスミドを含む)を導入する

。pTOK162 のDNAにはpBR322と相同な部分があるので、pBR322誘導体は相同配列を介した組み換えによりpTOK612 に組み込まれることになる。pBR322はpTOK162 と異なりAgrobacterium tumefaciens 中では複製できないので、このような組み込まれた状態 (pTOK162::pBR322 誘導体という) でなければAgrobacterium tumefaciens 中で生存することができない。そして、pTOK162 とpBR322誘導体のそれぞれに特異的な特性 (薬剤耐性等) について選抜すれば、pTOK162::pBR322 誘導体を有するAgrobacterium tumefaciens を得ることができる。さらに、pTOK162 を有するAgrobacterium tumefaciens に各種のプラスミドを導入して研究したところ、pBR322誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポゾンTn7 (デグリーブラ、Plasmid 6: 235-248, 1981) 由来のスペクチノマシン耐性遺伝子 (SP) が優れていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子がpBR322にクローン化されている場合には、SP遺伝子をそのプラスミドに挿入すれば、Agrobacterium tumefaciens 内の相同組換えにより、pTOK162 のT領域に所望の遺伝子を導入することができる。またその他の場合には、pBR322由来のDNAとSP遺伝子から構成されるプラスミドを用意しておいて、これに所望の遺伝子を挿入する方法も考えられる。この際、T領域の境界配列を活用すれば、最終的に、pTOK162 上において、カナマイシン耐性遺伝子と所望の遺伝子を別々のT領域中に配置することも可能である。カナマイシン耐性をマーカーとして植物を形質転換した場合、両T領域とも導入される場合も相当の比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分達成できる。また、両T領域が別々の染色体に組み込まれる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子から分離することも可能となる。

【0024】

寄主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens を好ましく用いることができる。

【0025】

プラスミドをAgrobacterium tumefaciens 等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例えば、細菌の三系交雑手法 (ディッターら、Pro.Natl.Acad.Sci.USA, 77:7347-7351, 1980年) により行うことが

できる。

【0026】

このようにして調製されるアグロバクテリウム属細菌には、pTOK162 由来のウイルス能力の高いDNAが含まれるので、高い効率で単子葉植物の形質転換を行うことが可能である。

【0027】

尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様にT領域の境界配列の間に配置されるものであるが、アグロバクテリウム属細菌中で、Tiプラスミド上に配置されてもよく又は他のプラスミド上に配置されてもよい。

【0028】

アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の培養組織を形質転換する方法は、培養組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^7 \sim 10^{10}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に培養組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。あるいは、培養組織の培養液中にアグロバクテリウム属細菌を添加して共存培養することにより形質転換を行うこともできる。

【0029】

形質転換した培養組織は、その後、公知の方法により培養を行う。これにより、形質転換により所望の形質を獲得した植物体を再生することができる。

【0030】

【発明の効果】

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでもあるが、前述のとおり確立された方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用いられていない培養組織に本発明で改良した方法でアグロバクテリウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発

明の方法では、材料調製が容易なカルス等の培養組織を用いるので、生長点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることができる。また、培養組織を形質転換するので、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーバイナリーベクターを用いれば、一部のイネの品種のように培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入することが可能になった。さらに、後述の実施例に記載するように、適切な接種後の選抜法を採用すれば、目的遺伝子がキメラ状に導入されるキメラ現象を低減させることもできる。

【0031】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0032】

(1) 供試培養組織の調製

(i) イネの品種

日本稲品種、朝の光、月の光及びコシヒカリを選定して供試した。

【0033】

(ii) 胚盤、胚盤カルス

イネの完熟種子を70%エタノールに1分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに30分間浸漬することによって消毒した後、2N6固体培地(N6の無機塩類及びビタミン類(Chu C.C. 1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp.43-50)、1g/1カザミノ酸、2mg/1 2,4-D、30g/1ショ糖、2g/1ゲルライト)に置床した。また、完熟種子を置床後4日目に種子より胚盤部位を摘出し胚盤として供試した。約3週間培養後、形成された胚盤由来のカルスを2N6培地に移植し、4日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

【0034】

(iii) 茎頂組織

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2N6固体培地(1/2量の

N6の主要無機塩類及び微量塩類、N6ビタミン類、1 g/l カザミノ酸、20 g/l ショ糖、2 g/l ゲルライト) に置床し、培養3日後の幼苗から、頂端分裂組織を含む2~3 mmの組織を切り出し、材料とした。

【0035】

(iv) 幼根組織、幼根カルス

(iii) の方法で得た幼植物体から種子根の先端部を5~10 mm切り出して材料とした。また、これらの幼根を2N6固体培地上で約2週間培養して得たカルスを幼根カルスとして用いた。

【0036】

(v) 懸濁培養細胞

(ii) の方法で得た胚盤由来のカルスをAA液体培地 (AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類 (Toriyama and Hinata 1985; Plant Science 41:179-183, MS微量塩類 (Murashige and Skoog 1962; Physiol. Plant. 15:473-497)、0.5 g/l カザミノ酸、1 mg/l 2,4-D、0.2 mg/l カイネチン、0.1 mg/l ジベレリン、20 g/l ショ糖) に移し、25℃、暗黒下で120 rpmで振盪することによって懸濁培養細胞を得た。なお、培地の更新は1週間毎に行った。

【0037】

(2) Tiプラスミド (バイナリーベクター)

ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT) 及びGUS遺伝子をTiプラスミドのT-DNA領域に組み込んだ、以下のプラスミドを作製した。

【0038】

(i) pIG121 H<sup>+</sup>: ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イントロンを含むGUS遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら、1991; 植物バイオテクノロジーII (現代化学増刊、pp.123-132)。名古屋大学、中村氏より入手)。

【0039】

(ii) pTOK232:

1. イントロンGUS及びハイグロマイシン抵抗性遺伝子の中間ベクター pTOK229への導入

Tn7由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含むC1aI断片(2.5kb)をクレノー処理により末端を平滑化し、これをpUC19のSmaI部位に挿入し、アンピシリン及びスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミドpTOK107(5.2kb)を得た。pTOK107をEcoRI、HindIIで処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む2.5kb断片をpGA482のEcoRI、HindIII断片(2.7kb)と連結し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子とHindIII、HpaI部位を含むpTOK170(5.2kb)を得た。

【0040】

85Sプロモーターにヒマのカタラーゼの第1イントロンとGUS遺伝子を連結したベクターpIG221(Ohta et al., 1990,名古屋大学中村氏より譲渡)をEcoRIで切断後クレノー酵素により末端を平滑化しHindIIIリンカー(pCAAGCTTG;タカラ酒造コード4660P)を挿入した。35Sプロモーター及びイントロンGUSを含む断片をHindIIIにより切り出し、35Sプロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結したプラスミドpGL2(J. Paszkowski, Friedrich Miescher Instituteより入手)のHindIII部位に挿入しpGL2-IG(7.6kb)を得た。なお、pGL2はpDH51(Pietrazak et al., 1986; Nucleic Acids Research 14:5857-5868)にハイグロマイシン抵抗性遺伝子(Gritz L. and Davis J. 1983; Gene 25:179-188)を挿入したものである。pTOK170をHpaI処理して得られた断片をpGL2-IGのPvuII断片(5.2kb)と連結しpTOK229(10.1kb)を得た。

【0041】

2) スーパーバイナリーベクターpTOK162への導入

バイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA281由来のvirB、virC、virG遺伝子を挿入して得たスーパーバイナリーベクターpTOK162への目的遺伝子(ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGUS遺伝子)の導入は相同組換えによって行った。すなわち、両ベクターは大腸菌プラスミドpBR322に由来する部位を持つので、スペクチノマイシン、カナマイシ

ンで選抜された菌には両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが含まれることになる。スーパーバイナリーベクターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGUS遺伝子が組み込まれたプラスミドをpTOK232と呼ぶ(図1参照)。

【0042】

(3) 寄主アグロバクテリウム

T-DNA 領域を削除した菌系、LBA4404とEHA101とを寄主バクテリアとして使用した。LBA4404はヘルパープラスミド(vir領域を完全な形で持つ)PAL4404を有する菌系であり、American Type Culture Collectionより入手可能である(ATCC 37349)。EHA101はヘルパープラスミドのvir領域が強病原性アグロバクテリウムA281由来であり、Hood E. E. et al. 1986から入手可能である。

【0043】

(2)項で述べた種々のバイナリーベクターをこれら2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の菌系を遺伝子導入用として用いた。これらのプラスミドをアグロバクテリウムに導入する方法は細菌の三系交雑手法(Ditta G. et al. 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351)によった。

LBA4404(pTOK232)

LBA4404(pIG121H $\Delta$ )

EHA101 (pIG121H $\Delta$ )

【0044】

(4) アグロバクテリウム懸濁液の調製

ハイグロマイシン(50  $\mu$ g/ml)とカナマイシン(50  $\mu$ g/ml)を含むAB培地(Drlica K. A. and Kado C. I. 1974; Proc. Natl Acad. Sci. USA 71:3677-3681)上で3~10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地(前述のAA培地において、ショ糖を0.2M、グルコースを0.2Mに変更し、アセトシリノンを100  $\mu$ M添加、pH5.2)に懸濁し、菌濃度を3~5 $\times 10^9$ 細胞/mlに調整し接種に用いた。

【0045】

(5) 接種条件



供試組織を滅菌水で洗浄後、上述のアグロバクテリウムの懸濁液に3～10分間浸漬した。浸漬処理後、茎頂組織は100  $\mu$ M アセトシリンゴン、10g/l グルコース、20g/l ショ糖を含むN6S3固体培地(1/2 N6 主要無機塩類、N6微量塩類、N6ビタミン類、Chu C.C.1978、AAアミノ酸(Toriyama and Hinata 1985), 1 g/l カザミノ酸、0.2 mg/l NAA、1.0 mg/l カイネチン、3 g/l ゲルライト)に、胚盤カルスなどのその他の培養組織はアセトシリンゴン、グルコース、ショ糖を同濃度で含む2N6固体培地に移植し、25℃、暗黒下で2～5日間培養した。その後、接種組織を250 mg/l セフトキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフトキシムを含むそれぞれの固体培地で培養を続けた。

【0046】

#### (6) GUS活性の調査方法

共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100 を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37℃で1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを洗浄除去した後、0.1 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルコン酸(X-gluc)及び20%メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37℃で24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組織数に対する百分率で表した。なお、選抜処理後得られた形質転換体と考えられる植物体でのGUS活性の判定に際しては、植物体から葉片を採取し、同様な方法に従ってGUS染色を行った。

【0047】

#### (7) 形質転換細胞、組織の選抜

##### (i) 茎頂組織

5日間アグロバクテリウムと共存培養した茎頂組織を250 mg/lセフトキシムを含むN6S3培地で2週間培養し、生長した茎頂組織を40 mg/lハイグロマイシンを含むN6S3培地に移して、形質転換体の選抜を行った。

【0048】

##### (ii) 培養組織(胚盤カルス)

3日間共存培養した培養組織を、250 mg/lセフトキシムを含む2N6培地で1週間培養した後、同培養組織を50 mg/lハイグロマイシンを含む2

N6培地で3週間培養してハイグロマイシン抵抗性の培養組織を選抜した（1次選抜）。得られた抵抗性組織をさらに50mg/lハイグロマイシンを含むN6-12培地（N6無機塩類、N6ビタミン類、2g/lカザミノ酸、0.2mg/l2,4-D、0.5mg/l6BA、5mg/lABA、30g/lソルビトール、20g/lシヨ糖、2g/lゲルライト）で2～3週間培養し（2次選抜）、この培地上で増殖したカルスを0、20、50mg/lハイグロマイシンを含む個体再生用培地N6S3に移した。なお、共存培養後の培地には全て250mg/lセフトキシムを添加した。

【0049】

(8) イネでの供試材料の違いによる遺伝子導入効率（共存培養後におけるGUS発現）

アグロバクテリウムが単子葉作物の細胞に遺伝子を導入することが可能であることを確認するため、強病原性のvir領域を持つアグロバクテリウムEHA101にハイグロマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を持つバイナリーベクターpIG121H<sup>+</sup>（上述）を導入した菌をイネ品種月の光の種々の組織に処理し、共存培養後にGUS活性を調査した。供試組織は茎頂、幼根、胚盤、幼根カルス、胚盤カルス及び懸濁培養細胞である。アグロバクテリウムで処理しなかった場合は、いずれの材料でも青色のGUS発現を示すものは認められなかった。一方、アグロバクテリウムEHA101（pIG121H<sup>+</sup>）で処理した場合には、幼根を除く組織でGUSの発現が確認された。処理組織数に対する青色を呈する組織の割合では胚盤カルスが最も高かった（表1）。さらに、GUSを発現する組織の大きさでも胚盤カルスが優れていた。胚盤カルスに次いで高い導入率を示した組織は茎頂であったが、茎頂組織をハイグロマイシン抵抗性に関する選抜を行ったところ全ての組織が枯死し、抵抗性組織は得られなかった。茎頂は生長点を含む組織であるが、遺伝子の導入処理を行った後、抵抗性組織が増殖するためには、遺伝子が限られた生長点に導入される必要がある。アグロバクテリウムとの共存培養処理後、茎頂には多数の遺伝子が導入されているものの抵抗性組織が得られなかったことは、生長点近傍に導入される確率は低いと考えられる。このようなことから、アグロバクテリウムを用いる方法では、材料としては、胚盤カルス、あるいは

その他の組織からのカルスが適当と判断される。

【表1】

表1 供試材料の違いによるGUS遺伝子の導入効率（品種：月の光、  
菌系：EHA101/pIG121Hm）

供試組織	GUS+の組織数/処理組織数 (%)		処理組織に対する GUS染色部位の大きさ
	無処理区	処理区	
茎頂	0/ 30 (0)	109/157 (69)	+++
幼根	0/ 20 (0)	0/ 30 (0)	
幼根カルス	0/ 30 (0)	24/115 (20)	+
胚盤	0/ 50 (0)	8/ 89 (9)	+
胚盤カルス	0/141 (0)	312/395 (79)	+++
懸濁培養細胞	0/232 (0)	61/247 (25)	++

+: 1%以下、++: 1~10%、+++ : 10%以上

【0050】

この実験で使用したバイナリーベクター pIG121HmではGUS遺伝子のプロモーターの中にヒマのイントロンが挿入されているため、アグロバクテリウムの細胞の中ではGUS遺伝子は発現しないことが確認されている（中村ら、1991）。以上のことから、共存培養後のGUS遺伝子の発現を指標とした場合、アグロバクテリウムはイネ細胞に遺伝子を導入できることが確認された。

【0051】

(9) イネの品種による遺伝子導入効率の違い（共存培養後におけるGUS発現）

培養細胞の確立、培養細胞から個体再生に関しては大きな品種間差異が存在する (Mikami and Kinoshita 1988; Plant Cell Tissue Organ Cult. 12:311-314)。日本稲の中ではコシヒカリは培養が困難とされている。一方、前項で用いた月の光は比較的培養が容易である。アグロバクテリウムによる形質転換法を用いる場合、このような品種間差異があると実用的には不都合である。この点を明らかにするため、コシヒカリと月の光の培養容易性の異なる2品種を用いてアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率の差異を調査した。供試組織は胚盤カルスとし、アグロバクテリウムとしてはEHA101 (pIG121H $\Delta$ ) 及びLBA4404 (pIG121H $\Delta$ ) を用いた。

【0052】

月の光では各実験を通じて90%以上のカルスでGUS活性が認められたが、コシヒカリではこれより低い率でGUS活性が認められた(表2)。従って、EHA101 (pIG121H $\Delta$ ) あるいはLBA4404 (pIG121H $\Delta$ ) を用いた場合には、導入効率に関する品種間差異があるものと解釈される。

【表2】

表2 アグロバクテリウムの菌系とイネ品種の違いによるGUS遺伝子の導入効率

		GUS+の組数/処理組数 (%)		
		菌 系		
品種	実験	LBA4404(pIG121Hm)	EHA101(pIG121Hm)	LBA4404(pTOK232)
月の光	1	67/70 (96)	78/87 (90)	64/66 (97)
月の光	2	72/86 (84)	68/73 (93)	82/82 (100)
コシヒカリ	1	46/135 (34)	43/116 (37)	124/131 (95)
コシヒカリ	2	28/107 (26)	81/143 (57)	102/103 (99)

【0053】

(10)アグロバクテリウムの菌系による遺伝子導入効率の違い（共存培養後におけるGUS発現）

EHA101 (pIG121Hm) はヘルパープラスミドに強病原性アグロバクテリウムA281のvir領域を持つ。LBA4404 (pIG121Hm) は通常のvir領域を持つ。一方、LBA4404 (pTOK232)はヘルパープラスミドのvir領域は通常型であるが、バイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA281のvir領域の一部の遺伝子を有する。そして、このバイナリーベクターはpTOK162 から派生したもので、LBA4404 (pTOK162)は双子葉作物の中でも形質転換の困難な植物種に極めて高率で形質転換を可能とした (Saito Y. et al., 1992; Theor. Appl. Genet. 83:679-683)。このように、強病原性のvir領域の存在そのもの、あるいは存在形態は形質転換の効率に大きく影響する可能性があ

る。そこで、強病原性の *vir* 遺伝子に関して異なる上記の3種類のアグロバクテリウムを用いて、GUS 遺伝子の発現に関する導入効率を比較した。なお、供試材料はコシヒカリ、月の光の胚盤カルスである。

【0054】

強病原性の *vir* 領域を持たない LBA4404 (pIG121H $\blacksquare$ ) でも両品種とも GUS 活性を示す組織が認められたが、コシヒカリではその率は30%程度と低かった。ヘルパープラスミドに強病原性の *vir* を持つ EHA101 (pIG121H $\blacksquare$ ) ではコシヒカリの導入率はやや上昇した。バイナリーベクターに強病原性の *vir* を持つ LBA4404 (pTOK232) ではコシヒカリでも月の光と同様に95%以上の組織で GUS 活性が認められた(表2)。さらに、GUS 活性を示すそれぞれの組織での青色領域の面積に関しては、LBA4404 (pTOK232) で最も大きく、高い導入率を示すことが観察された。

【0055】

(11) 菌系の違いによる選抜効率 (ハイグロマイシン耐性カルス)

上項と同じ3つの菌系を用いて、月の光、コシヒカリの胚盤カルスとの共存培養後のハイグロマイシン抵抗性カルスの選抜率に関する比較を行った。抵抗性カルスの出現率に関しては LBA4404 (pTOK232) が最も高く、抵抗性カルスの選抜率に関する品種間差異は認められなかった(表3)。LBA4404 (pIG121H $\blacksquare$ ) あるいは EHA101 (pIG121H $\blacksquare$ ) の2つの菌系では、選抜率は低く、さらに培養困難なコシヒカリではハイグロマイシン抵抗性カルスの出現は2%程度にとどまった。従って、イネの形質転換に用いるアグロバクテリウムとしてはバイナリーベクターに強病原性の *vir* 遺伝子の一部を持つ LBA4404 (pTOK232) が最も優れていると判定される。

【表3】

表3 アグロバクテリウムの菌系の違いによる形質転換効率の違い (胚盤カルス)

		ハイグロマイシン抵抗性カルス数/処理カルス数 (%)		
		菌 系		
品種	実験	LBA4404 (pIG121Hm)	EHA101 (pIG121Hm)	LBA4404 (pTOK232)
月の光	1	91/338 (27)	139/301 (46)	169/305 (55)
月の光	2	59/421 (14)	66/425 (16)	110/360 (31)
月の光	3		10/521 (2)	174/644 (28)
月の光	4		20/349 (6)	100/349 (29)
コシヒカリ	1	6/269 (2)		65/283 (23)

【0056】

(12) ハイグロマイシン耐性形質転換体におけるGUS遺伝子の発現様式

このようにして得られた抵抗性カルスをさらに2次選抜にかけ、抵抗性カルスから個体を再生させた。再分化用の培地N6S3にハイグロマイシンを添加した区と無添加の区を設定したが、無添加の場合には、GUS活性がない個体あるいはキメラ状に活性を示す個体が多数出現した。しかし、再分化培地にハイグロマイシンを添加した場合はこのような個体は大幅に減少し、個体全体でGUS活性を示す再生個体が増加した(表4)。なお、アグロバクテリウムで処理しなかつ

た場合には、ハイグロマイシン抵抗性あるいはGUS活性を示す個体は得られなかった。従って、このようなハイグロマイシン抵抗性カルスから再生したGUS活性を全面に示す個体は形質転換体と考えられる。

【表4】

表4 ハイグロマイシン抵抗性カルスから再分化した植物におけるGUS遺伝子の発現（品種：朝の光、菌系：EHA101(pIG121Hm)

抵抗性カルス	再分化個体数	GUS遺伝子の発現		
		安定的陽性	キメラ	陰性
1	26	25	1	0
2	8	7	1	0

（個体の再分化までハイグロマイシンを添加）

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム属細菌に含まれるプラスミドの一例であるpTOK162の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTOK232の構築方法を示す図である。

【符号の説明】

- SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子
- HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子
- NPT カナマイシン抵抗性遺伝子
- TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子
- IG イントロンGUS遺伝子
- BR T-DNAの右ボーダー配列
- BL T-DNAの左ボーダー配列



特平 4-204464

vir B, C, G 強病原性アグロバクテリウムA281由来のvir領域

ORI ColE1の複製開始点

COS ラムダファージのCOS部位

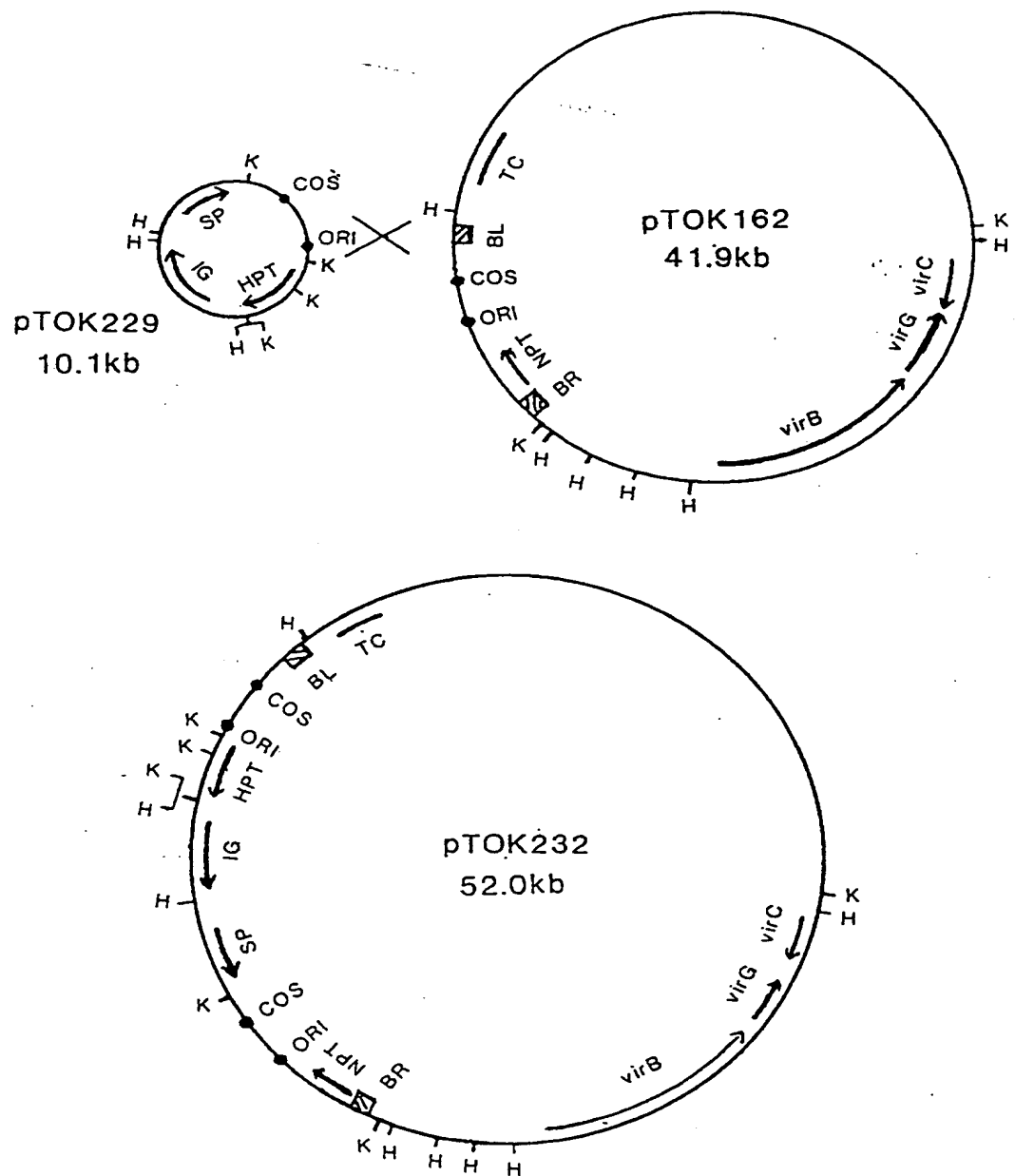
K 制限酵素KpnI部位

H 制限酵素HindIII 部位

【書類名】

図面

【図1】



【書類名】 明細書

【発明の名称】 単子葉植物の形質転換方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法。

【請求項2】 前記単子葉植物はイネである請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記アグロバクテリウム属細菌は、Agrobacterium tumefaciens のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域由来のDNA領域を含むプラスミドを導入したアグロバクテリウム属細菌である請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 前記プラスミドはpTOK162 又はその誘導体である請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記アグロバクテリウム属細菌は、Agrobacterium tumefaciens である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】 形質転換操作に用いるアグロバクテリウム属細菌の菌濃度が $10^7 \sim 10^{10}$ 細胞/mlである請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 前記培養組織はカルス誘導培地に置床後2日以上のカルス形成過程にある培養組織又はカルスである請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】 培養組織が正常な個体を再生する能力を有する組織である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

特平 4-204464

【電話番号】 03(3238)9182  
【手数料の表示】  
【納付方法】 特許印紙  
【納付金額】 14,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【物件名】 図面 1  
【包括委任状番号】 9100569

特平 4-204464

【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、そのため変異体の出現の頻度が低く、また、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供すること。

【構成】 所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供した。

【選択図】 図1

特平 4-204464

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【住所又は居所】 東京都品川区東品川4丁目12番62号

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100088546

【住所又は居所】 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル

6階 谷川国際特許事務所

【氏名又は名称】 谷川 英次郎

特平 4-204464

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004569]

1. 変更年月日 1991年 7月 1日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都品川区東品川4丁目12番62号

氏 名 日本たばこ産業株式会社

EP

US PCT

## 特許協力条約

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号	93PF092-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知(様式PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号	PCT/JP 93/00925	国際出願日 (日.月.年) 06.07.93	優先日 (日.月.年) 07.07.92
出願人(氏名又は名称) 日本たばこ産業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約とともに公表される図は、  
第  図とする。☐ 出願人が示したとおりである。  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。  
☒ なし



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 93/00925

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>3</sup> A01H1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>3</sup> A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST 科学技術文献ファイル BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	D. M. Raineri et. al., Biotechnology, Vol. 8, No. 1, p. 33-38 (1990)	1-13
Y	E. Jarchow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p. 10426-10430 (1991)	1-13
Y	BIO INDUSTRY, Vol. 8, No. 6, p. 365-373 (1991), 特に p 371 左欄参照	1-13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.93

国際調査報告の発送日

28.09.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

郡 山

電話番号 03-3581-1101 内線

2 B 8 5 0 2

3 2 3 6

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Vito S. Polito et. al. , Plant Cell Reports , Vol. 8 , No. 4 , p. 219-221	1-13

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 A01H 1/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 94/00977</p> <p>(43) 国際公開日 1994年1月20日 (20.01.1994)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP93/00925 (22) 国際出願日 1993年7月6日 (06. 07. 93)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平4/204464 1992年7月7日 (07. 07. 92) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) (JP/JP) 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 樋江井祐弘 (HIEI, Yukou) (JP/JP) 小崎敏彦 (KOMARI, Toshihiko) (JP/JP) 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US.</p>		<p>添付公開書類 国際調査報告</p>
<p>(54) Title : METHOD OF TRANSFORMING MONOCOTYLEDON</p> <p>(54) 発明の名称 単子葉植物の形質転換方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method of transforming monocotyledon which necessitates only a short period from the transformation to the generation of a plant body as compared with the conventional methods, thus reducing the frequency of occurrence of mutants, and can be generally applied to the plant for which any system of regenerating the plant body from the protoplast has not been established, and in which the material to be used can be readily prepared. The method comprises transforming cultured tissues of a monocotyledon under or after dedifferentiation with a bacterium of the genus <i>Agrobacterium</i> containing desired genes.</p>		

(57) 要約

従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、そのため変異体の出現の頻度が低く、また、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法が開示されている。すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供した。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェッコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		

-2-

、プロトプラストからの再生系が確立されていない植物種に有効である。形質転換効率は、遺伝子を打ち込んだ後の選抜に依存する。エレクトロポレーション法と効率を比較したデータはない(Gordon-Kamm W. J. et al., 1990; Plant Cell 2:603-618, Fromm M.E. et al., 1990; Bio/Technol. 8:833-839, Christou P. et al., 1991; Bio/Technol. 9:957-962)。

その他の方法としては、1) 種子、胚とDNAの共存培養(Topfer R. et al., 1989; Plant Cell 1:133-139, Ledoux L. et al., 1974 Nature 249:17-21)、2) 花粉管への処理(Luo and Wu 1988; Plant Mol. Biol. Rep. 6:165-)、3) リポソーム法(Caboche M. 1990; Physiol. Plant. 79:173-176, Gad A. E. et al., 1990:177-183)及び4) マイクロインジェクション法(Neuhaus G. et al., 1987; Theor. Appl. Genet. 75:30-36)があるが、形質転換の効率、再現性、あるいは汎用性に関して問題があり、一般的な方法とは言い難い。

一方、アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドをベクターとして用いた遺伝子導入法は、タバコ、ペチュニア、ナタネ等の双子葉作物の形質転換法として普遍的に用いられている。しかしながら、アグロバクテリウム属細菌の宿主は双子葉植物のみに限られ、単子葉植物には寄生しないとされている(De Cleene M. 1976; Bot. Rev. 42:389-466)。

アグロバクテリウムによる単子葉植物の形質転換に関してはアスパラガス(Bytebier B. et al., 1987; Proc. Natl. Acad. Sci. USA:84:5345-5349)、そしてヤム(Dioscorea bulbifera)(Schaferw, et al., 1987; Nature 327:529-532)で報告されているが、その他の単子葉植物、特にイネ科作物にはこの方法を適用できないとされている(Potrykus I. 1990; Bio/Technol. 8:535-543)。

Grimsley et al, 1987: Nature 325:177-179はアグロバクテリウムのT-DNAの中にトウモロコシストリークウイルス(Maize streak virus)のDNAを挿入したものをトウモロコシの生長点に接種したところ、トウモロコシストリークウイルスの感染を確認したことを報告している。トウモロコシストリークウイルスのDNAを接種しただけではこのような感染症状が認められないことから、上の観察結果はアグロバクテリウムがトウモロコシにDNAを導入することができることを示すものと解釈している。しかし、ウイルスは核ゲノムに組み込まれな

## 明細書

## 単子葉植物の形質転換方法

## 技術分野

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関する。

## 背景技術

単子葉植物の形質転換方法としては、従来より、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法（PEG法）、パーティクルガン法その他が知られている。

エレクトロポレーション法は、プロトプラストと目的のDNAを混合し、電気刺激で細胞膜に穴を開けることによりDNAを細胞内に導入し、形質転換を図る方法である。現在、最も再現性のある手法で、この方法で種々の遺伝子が単子葉植物、特にイネに導入されている（Toriyama K. et al., 1988; Bio/Technol. 6:1072-1074, Shimamoto K. et al., 1989; Nature 338:274-276, Rhodes C. A. et al., 1989; Science 240:204-207）。しかしながら、この方法は、1）プロトプラストからの個体再生系が確立されている植物種にのみ適用可能である、2）プロトプラストから個体再生までには数か月を要するので、形質転換体を得るのに時間がかかる、3）培養期間が長期化するので、それに伴う培養変異の頻度が高くなり、正常な形質転換体を得る確率が低くなる、という問題点を有する。

PEG法は、目的遺伝子とプロトプラストとを混合し、PEGで処理することによって遺伝子の導入を図る方法であり、エレクトロポレーション法とは電気刺激がPEGに変わった点で異なる。導入効率はエレクトロポレーション法よりはいくぶん低いと考えられる。この方法で形質転換体を得た報告はあるものの、広く用いられているとは言い難い。プロトプラストを用いるため、エレクトロポレーション法と同様な問題点を持つ（Zhang W. et al., 1988; Theor. Appl. Genet. 76:835-840, Datta S.K. et al., 1990; Bio/Technol. 8:736-740）。

パーティクルガン法は、目的の遺伝子を微細な金属粒子に付着させ、金属粒子を高速で細胞あるいは組織に打ち込むことによって形質転換を行わせる方法である。従って、原理的にはあらゆる組織を対象に形質転換を行うことができ、特に

-3-

くても増殖する可能性があるので、この結果はT-DNAが核に組み込まれたことを示すものではない。その後、感染効率はトウモロコシの茎頂の生長点に接種した時が最も高く (Grimsley et al., 1988; Bio/Technol. 6:185-189)、感染にはアグロバクテリウムのプラスミドのvirC遺伝子が必須であることを示した (Grimsley et al., Mol. Gen. Genet. 217:309-316)。

Gould J. et al. (1991; Plant Physiol. 95:426-434) はトウモロコシの茎頂に針で傷をつけた後カナマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を持った強病原性アグロバクテリウムEHA1を接種し、処理後の茎頂組織をカナマイシンで選抜したところ、抵抗性を示す植物体を得た。この後代の種子の一部は導入した遺伝子を持つことをサザン分析で確認した (キメラ現象)。

Mooney P.A. et al., (1991; Plant Cell, Tissue, Organ Culture 25:209-218) は、アグロバクテリウムを用いて小麦の胚にカナマイシン抵抗性遺伝子の導入を試みた。まず、胚を酵素で処理し、細胞壁に傷をつける処理をし、その後アグロバクテリウムを接種した。処理したカルスのうち極めて少数のカナマイシン抵抗性と思われるカルスが増殖したが、このカルスからの植物体の再生はできなかった。また、カナマイシン抵抗性遺伝子の存在をサザン分析で確認したところ、全ての抵抗性カルスで導入遺伝子の構造変異が見られた。

Raineri et al. (1990; Bio/Technol. 8:33-38) はイネの胚盤に傷をつけた後、強病原性のアグロバクテリウムA281 (pTiBo542) をイネの8品種に処理したところ、日本晴、藤坂5号の2品種で腫瘍状の組織の増殖が見られた。さらに、T-DNAからホルモン合成遺伝子を除いたTiプラスミドにカナマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を挿入したプラスミドを持つアグロバクテリウムをイネの胚に接種したところカナマイシン抵抗性カルスの増殖が見られた。この抵抗性カルスではGUS遺伝子の発現が認められたが、形質転換植物を得ることはできなかった。これらのことから、アグロバクテリウムのT-DNAがイネ細胞に導入されたと解釈している。

このように、イネ、トウモロコシ、コムギ等のイネ科の作物でもアグロバクテリウムによる遺伝子導入が可能であることを示唆する研究報告が現れてきているが、まだ、再現性、導入効率、さらには遺伝子の導入の確認についても完全に説

-4-

得できる結果を示しているとは言い難い (Potrykus I. 1990; Bio/Technol. 8:5 35-543)。

上述のように、イネ科作物における遺伝子導入法は、エレクトロポレーション法が主流であるが、プロトプラストを用いるため、再生植物を得るまで長期間を要し、多大な労力がかかり、また長期間の培養により高頻度で変異体が出現するという危険性がある。また、この方法はプロトプラストからの再分化系が確立されていない作物、例えばトウモロコシには適用できない。そこで、上述のように、トウモロコシに対しては、生長点組織を用いることが試みられている (Gould J. et al., 1991)。しかし、生長点を単離する作業は多くの労力を要し、大量に調製することは必ずしも容易ではない。

#### 発明の開示

従って、本発明の目的は、従来の方法に比較して、形質転換から植物体の再生までの時間が短く、プロトプラストからの植物体の再生系が確立されていない植物に対しても普遍的に適用することができ、さらに用いる材料の調製が容易な単子葉植物の形質転換方法を提供することである。

本願発明者らは、アグロバクテリウムで処理する単子葉の植物組織、アグロバクテリウムの処理条件、及びバイナリーベクターの構成等が遺伝子導入効率に及ぼす影響等を鋭意研究した結果、単子葉植物の培養組織をアグロバクテリウム属細菌を用いて飛躍的に高い効率で再現性をもって形質転換することができることを見出し、これによれば上記目的を達成することができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、所望の遺伝子を含有するアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る、単子葉植物の形質転換方法を提供する。

本発明の方法により、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ等のイネ科植物を始めとする単子葉植物に目的の外来遺伝子を再現性良く導入することが初めて可能になった。アグロバクテリウムを用いた単子葉植物の形質転換方法はこれまでもあるが、前述のとおり確立された方法とは言い難い。しかし、本発明ではこれまでに用いられていない培養組織に本発明で改良した方法でアグロバクテリ



-5-

ウムを接種することにより、極めて容易に遺伝子を導入することができた。本発明の方法では、材料調製が容易なカルス等の培養組織を用いるので、生長点を用いる従来技術に比べて供試材料を容易に得ることができる。また、培養組織を形質転換するので、プロトプラストを形質転換する場合に比べて植物体再生までの時間が短く、変異の頻度が低下する。また、スーパーバイナリーベクターを用いれば、一部のイネの品種のように培養が困難な品種にも高い効率で遺伝子を導入することが可能になった。さらに、後述の実施例に記載するように、適切な接種後の選抜法を採用すれば、目的遺伝子がキメラ状に導入されるキメラ現象を低減させることもできる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の方法に用いることができるアグロバクテリウム属細菌に含まれるプラスミドの一例であるpTOK162の構造と本発明の実施例で用いたプラスミドpTOK232の構築方法を示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により形質転換される単子葉植物は、特に限定されるものではなく、イネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ、アスパラガスその他、いかなる単子葉植物にも適用可能である。

また、本発明の方法に供される培養組織は、単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織である。ここで、脱分化過程にある培養組織とは、外植片をオーキシン及びサイトカイニン等の植物生長調節物質を含む培地で培養することにより得られる組織で、カルス及び不定胚様組織が形成される前段階の組織を意味し、脱分化した培養組織とは外植片をオーキシン及びサイトカイニン等の植物生長調節物質を含む培地で培養することにより得られるカルス及び不定胚様組織を意味する。本発明で用いられる培養組織はいかなる部位由来のものであってもよく、例えば、胚盤、茎頂、幼根、未熟胚、花粉及び葯由来のものを挙げることができる。本発明で用いられる培養組織としては、脱分化誘導培地に外植片を置床した後7日以上経過したカルス形成過程にある培養組織、又はカルス及び不定胚様組織を用いることが好ましい。中でも、カルス及び不定胚様組織を培養組織として用いることが最も好ましい。脱分化誘導培地はこの分野におい

-6-

て周知であり、例えばN 6 培地 (Chu C.C. 1987; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp.43-50)の主要無機塩類及びビタミン類に 2 m g / l 2, 4-D、1 g / l カザミノ酸、3 0 g / l シヨ糖、2 g / l ゲルライトを添加した培地及びL S 培地 (Linsmaier, E., and Skoog, F. 1965; Physiol. Plant 18:100-127) の無機塩及びビタミン類に 1 0 0 m g / l カザミノ酸、7 0 0 m g / l プロリン、1. 5 m g / l 2, 4-D、2 0 g / l シヨ糖、2. 3 g / l ゲルライトを添加した培地等を用いることができる。もっとも、本発明の方法に用いる培養組織は必ずしもカルスである必要はなく、懸濁細胞であってもよい。

形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌は、従来より双子葉植物の形質転換に用いられているものを用いることができる。これらのものの多くは Agrobacterium tumefaciens 由来の T i プラスミドのヴィルレンス領域 (vir 領域) 由来の DNA 領域を含むベクターを有しており、植物に付与しようとする形質を担う遺伝子はこのベクター中に挿入されるか又はこのベクターとは別のプラスミド中に存在し、相同組換え等により T i プラスミド中に in vivo で挿入されるものである。また、本願発明者らは、先に、Agrobacterium tumefaciens A281 という強病原性の、形質転換効率が極めて高い株 (Hood E.E. et al., 1984; Bio/Technol. 2:702-709, Hood E.E. et al., 1986; J. Bacteriol. 168:1283-1290, Komari T. et al., 1986; J. Bacteriol. 166:88-94, Jin S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169:4417-4425, Komari T. 1989; Plant Science 60:223-229 ATCC37394) に含まれる T i プラスミド p T i B o 5 4 2 (Jin S. et al., 1987; J. Bacteriol. 169:4417-4425) のヴィルレンス領域 (vir 領域) 由来の DNA 領域を含むベクター (本明細書において、このベクターを「スーパーバイナリーベクター」と呼ぶことがある) を開発した (特開平 4-222527 号)。このようなスーパーバイナリーベクターを本発明において好ましく用いることができる。

このようなスーパーバイナリーベクターの例として pTOK162 (特開平 4-222527 号、欧州特許公開第 504869 号、米国特許出願第 07/854, 844 号) を挙げるることができる。その構造を図 1 に示す。このプラスミドは、大

-7-

腸菌及び Agrobacterium tumefaciens 中で増殖可能である pTOK154 と呼ばれるプラスミド (Ti プラスミドから誘導された公知の pGA472 プラスミドと pVCK101 と呼ばれる公知の広宿主域プラスミドから後述の方法により構築された、T 領域を含むプラスミド) に pTiBo542 のヴィルレンス領域由来の既にクローン化されていた上記 15. 2 キロベースの KpnI 断片 (virB、virG、virC 各遺伝子を含む) を組み込んだものである。この pTOK154 には、T 領域の 2 つの境界配列とその間に単子葉植物に導入しようとする遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子が配列されており、この例は、単子葉植物に導入しようとする遺伝子が pTiBo542 のヴィルレンス領域由来のクローン化された DNA 断片を含有するプラスミド上に配置されている例である。なお、図 1 中の各符号は次の意味を有する。

SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子

HPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子

NPT カナマイシン抵抗性遺伝子

TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子

IG イントロン GUS 遺伝子

BR T-DNA の右ボーダー配列

BL T-DNA の左ボーダー配列

virB, C, G 強病原性アグロバクテリウム A281 由来の vir 領域

ORI ColE1 の複製開始点

COS ラムダファージの COS 部位

K 制限酵素 KpnI 部位

H 制限酵素 HindIII 部位

単子葉植物に組み込もうとする所望の遺伝子は、上記プラスミドの T 領域中の制限酵素部位に常法により組み込むことができ、プラスミドが有する薬剤耐性等の適当な選択マーカーに基づいて選択することができる。もっとも、図 1 に示す pTOK162 のように、大型で多数の制限部位を持つものは、通常のサブクローニングの手法では所望の DNA を T 領域内に導入することが必ずしも容易ではないことがある。このような場合には、Agrobacterium tumefaciens 細胞内の *in vivo* 系での相同組換え (Herrera-Estrella L. et al., 1983; EMBO J. 2:987-995, H

-8-

orsch R.H. et al., 1984; Science 223:496-498) を利用することにより、目的の DNA を pTOK162 に導入することが可能になる。すなわち、例えば、先ず、pTOK162 を Agrobacterium tumefaciens に導入しておいて、この菌にさらに所望 DNA を導入した pBR322 と呼ばれるプラスミド（類似のプラスミドを含む）を導入する。pTOK162 の DNA には pBR322 と相同な部分があるので、pBR322 誘導体は相同配列を介した組み換えにより pTOK162 に組み込まれることになる。pBR322 は pTOK162 と異なり Agrobacterium tumefaciens 中では複製できないので、このような組み込まれた状態（pTOK162::pBR322 誘導体という）でなければ Agrobacterium tumefaciens 中で生存することができない。そして、pTOK162 と pBR322 誘導体のそれぞれに特異的な特性（薬剤耐性等）について選抜すれば、pTOK162::pBR322 誘導体を有する Agrobacterium tumefaciens を得ることができる。さらに、pTOK162 を有する Agrobacterium tumefaciens に各種のプラスミドを導入して研究したところ、pBR322 誘導体の選抜マーカーとしては、トランスポゾン Tn 7 (De Greve H.H. et al., 1981; Plasmid 6:235-248) 由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子 (SP) が優れていることが判明した。従って、すでに所望の遺伝子が pBR322 にクローン化されている場合には、SP 遺伝子をそのプラスミドに挿入すれば、Agrobacterium tumefaciens 内の相同組換えにより、pTOK162 の T 領域に所望の遺伝子を導入することができる。またその他の場合には、pBR322 由来の DNA と SP 遺伝子から構成されるプラスミドを用意しておいて、これに所望の遺伝子を挿入する方法も考えられる。この際、T 領域の境界配列を活用すれば、最終的に、pTOK162 上において、カナマイシン耐性遺伝子と所望の遺伝子を別々の T 領域中に配置することも可能である。カナマイシン耐性をマーカーとして植物を形質転換した場合、両 T 領域とも導入される場合も相当の比率で生じるわけであるので、目的遺伝子の導入は十分達成できる。また、両 T 領域が別々の染色体に組み込まれる場合もあり得るので、後に目的の遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子から分離することも可能となる。

単子葉植物に導入しようとする所望の遺伝子は、何ら限定されるものではなく、望まれる性質を付与することができるあらゆる遺伝子が包含される。例えば、除草剤抵抗性遺伝子、抗生物質抵抗性遺伝子、ウイルス病抵抗性を付与するため

-10-

れにより、形質転換により所望の形質を獲得した植物体を再生することができる

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

のウイルスのコート蛋白質遺伝子及び胚乳の澱粉形質関連遺伝子などを挙げることができるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

寄主となるアグロバクテリウム属細菌としては、特に限定されないが、Agrobacterium tumefaciens を好ましく用いることができる。

プラスミドをAgrobacterium tumefaciens 等のアグロバクテリウム属細菌に導入する操作は従来法により行うことができ、例えば、細菌の三系交雑手法 (Ditta G. et al., 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351) により行うことができる。

このようにして調製されるアグロバクテリウム属細菌には、pTOK162 由来のウイルス能力の高いDNAが含まれるので、高い効率で単子葉植物の形質転換を行うことが可能である。

尚、本発明においては、単子葉植物に導入しようとする遺伝子は、従来の技術と同様にT領域の境界配列の間に配置されるものであるが、アグロバクテリウム属細菌中で、Tiプラスミド上に配置されてもよく又は他のプラスミド上に配置されてもよい。

アグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の培養組織を形質転換する方法は、培養組織をアグロバクテリウム属細菌と単に接触させることにより行うことができる。例えば、 $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/ml程度の細胞濃度のアグロバクテリウム属細菌懸濁液を調製し、この懸濁液中に培養組織を3～10分間程度浸漬後、固体培地上で数日間共存培養することにより行うことができる。あるいは、培養組織の培養液中にアグロバクテリウム属細菌を添加して共存培養することにより形質転換を行うこともできる。このように、本発明の方法では、培養組織を酵素処理や傷つける等の前処理を行わずに形質転換に供することができる。

形質転換に供試した培養組織は、その後、脱分化過程又は脱分化状態で形質転換細胞又は形質転換組織を選抜することが好ましい。これは当該培養組織をオーキシン、サイトカイニン等の植物生長調節物質を含み、ハイグロマイシン等の選抜マーカー及びアグロバクテリウム属細菌に対する抗生物質を添加した培地で培養することにより行うことができる。

選抜した細胞又は組織は公知の方法により再分化培養を行うことができる。こ

### 実施例 1

#### (1) 供試培養組織の調製

##### (i) イネの品種

日本稲品種、朝の光、月の光及びコシヒカリを選定して供試した。

##### (ii) 胚盤、胚盤カルス

イネの完熟種子を70%エタノールに1分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに30分間浸漬することによって消毒した後、2N6固体培地(N6の無機塩類及びビタミン類(Chu C.C. 1978; Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp.43-50)、1g/l カザミノ酸、2mg/l 2,4-D、30g/l ショ糖、2g/l ゲルライト)に置床した。また、完熟種子を置床後4日目に種子より胚盤部位を摘出し胚盤として供試した。完熟種子を約3週間培養後、形成された胚盤由来のカルスを2N6培地に移植し、4~7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

##### (iii) 茎頂組織

イネの完熟種子を上記の方法で消毒した後、1/2N6固体培地(1/2量のN6の主要無機塩類及び微量塩類、N6ビタミン類、1g/l カザミノ酸、20g/l ショ糖、2g/l ゲルライト)に置床し、培養3日後の幼苗から、頂端分裂組織を含む2~3mmの組織を切り出し、材料とした。

##### (iv) 幼根組織、幼根カルス

(iii)の方法で得た幼植物体から種子根の先端部を5~10mm切り出して材料とした。また、これらの幼根を2N6固体培地上で約2週間培養して得たカルスを幼根カルスとして用いた。

##### (v) 懸濁培養細胞

(ii)の方法で得た胚盤由来のカルスをAA液体培地(AA主要無機塩類、AAアミノ酸及びAAビタミン類(Toriyama and Hinata 1985; Plant Science 41:179-183, MS微量塩類(Murashige and Skoog 1962; Physiol. Plant. 15:473-497)、0.5g/l カザミノ酸、1mg/l 2,4-D、0.2mg/l カイネチン、0.1mg/l ジベレリン、20g/l ショ糖)に移し、25℃、暗黒下で120rpmで振盪することによって懸濁培養細胞を得た。なお、培地の更新は1週間毎に行った。

(2) T i プラスミド (バイナリーベクター)<sup>-12-</sup>

ハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (HPT) 及び  $\beta$ -D-グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子を T i プラスミドの T-DNA 領域に組み込んだ、以下のプラスミドを作製した。

(i) pIG121 Hm: ヒマのカタラーゼ遺伝子の第 1 イントロンを含む GUS 遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子と連結したプラスミド (中村ら、1991; 植物バイオテクノロジー II (現代化学増刊、pp. 123-132)、名古屋大学、中村氏より入手)。

(ii) pTOK232:

1. イントロン GUS 及びハイグロマイシン抵抗性遺伝子の中間ベクター pTOK229 への導入

Tn7 由来のスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む Cla I 断片 (2.5 kb) をクレノー処理により末端を平滑化し、これを pUC19 の Sma I 部位に挿入し、アンピシリン及びスペクチノマイシン抵抗性遺伝子を持つプラスミド pTOK107 (5.2 kb) を得た。pTOK107 を EcoRI、HindII I で処理し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子を含む 2.5 kb 断片を pGA482 の EcoRI、HindIII 断片 (2.7 kb) と連結し、スペクチノマイシン抵抗性遺伝子と HindIII、Hpa I 部位を含む pTOK170 (5.2 kb) を得た。

35S プロモーターにヒマのカタラーゼの第 1 イントロンと GUS 遺伝子を連結したベクター pIG221 (Ohta S. et al., 1990; Plant Cell Physiol. 31:805-813, 名古屋大学中村氏より譲渡) を EcoRI で切断後クレノー酵素により末端を平滑化し HindIII リンカー (pCAAGCTTG; タカラ酒造コード 4660P) を挿入した。35S プロモーター及びイントロン GUS を含む断片を HindIII により切り出し、35S プロモーターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子を連結したプラスミド pGL2 (J. Paszkowski, Friedrich Miescher Institute より入手) の HindIII 部位に挿入し pGL2-IG (7.6 kb) を得た。なお、pGL2 は pDH51 (Pietrazak et al., 1986; Nucleic Acids Research 14:5857-5868) にハイグロマイシン抵抗性遺伝子 (Gritz L. and Da



-13-

vis J. 1983; Gene 25:179-188) を挿入したものである。pTOK170をHpaI処理して得られた断片をpGL2-IGのPvuII断片(5.2kb)と連結しpTOK229(10.1kb)を得た。

## 2) スーパーバイナリーベクターpTOK162への導入

バイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA281由来のvirB、virC、virG遺伝子を挿入して得たスーパーバイナリーベクターpTOK162への目的遺伝子(ハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGUS遺伝子)の導入は相同組換えによって行った。すなわち、両ベクターは大腸菌プラスミドpBR322に由来する部位を持つので、スペクチノマイシン、カナマイシンで選抜された菌には両プラスミドの組換えによって生じたプラスミドのみが含まれることになる。スーパーバイナリーベクターにハイグロマイシン抵抗性遺伝子、イントロンGUS遺伝子が組み込まれたプラスミドをpTOK232と呼ぶ(図1参照)。

## (3) 寄主アグロバクテリウム

T-DNA 領域を削除した菌系、LBA4404とEHA101とを寄主バクテリアとして使用した。LBA4404はヘルパープラスミド(vir領域を完全な形で持つ)PAL4404を有する菌系であり、American Type Culture Collectionより入手可能である(ATCC 37349)。EHA101はヘルパープラスミドのvir領域が強病原性アグロバクテリウムA281由来であり、Hood E. E. et al. 1986から入手可能である。

(2) 項で述べた種々のバイナリーベクターをこれら2種類のアグロバクテリウムに導入し、以下の菌系を遺伝子導入用として用いた。これらのプラスミドをアグロバクテリウムに導入する方法は細菌の三系交雑手法(Ditta G. et al. 1980; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7347-7351)によった。

LBA4404(pTOK232)

LBA4404(pIG121Hm)

EHA101 (pIG121Hm)

## (4) アグロバクテリウム懸濁液の調製

ハイグロマイシン(50 µg/ml) とカナマイシン(50 µg/ml) を含むAB培地( Dr

-14-

lica K. A. and Kado C. I. 1974; Proc. Natl Acad. Sci. USA 71:3677-3681)  
上で3～10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地（前述のAA培地において、ショ糖を0.2M、グルコースを0.2Mに変更し、アセトシリンゴンを100 $\mu$ M添加、pH5.2）に懸濁し、菌濃度を3～5 $\times 10^9$ 細胞/mlに調整し接種に用いた。

#### (5) 接種条件

供試組織を滅菌水で洗浄後、上述のアグロバクテリウムの懸濁液に3～10分間浸漬した。浸漬処理後、茎頂組織は100 $\mu$ Mアセトシリンゴン、10g/lグルコース、20g/lショ糖を含むN6S3固体培地(1/2 N6 主要無機塩類、N6微量塩類、N6ビタミン類、Chu C.C.1978、AAアミノ酸(Toriyama and Hinata 1985), 1g/lカザミノ酸、0.2 mg/l NAA、1.0 mg/lカイネチン、3g/lゲルライト)に、胚盤カルスなどのその他の培養組織はアセトシリンゴン、グルコース、ショ糖を同濃度で含む2N6固体培地に移植し、25 $^{\circ}$ C、暗黒下で2～5日間培養した。その後、接種組織を250 mg/lセフォタキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフォタキシムを含むそれぞれの固体培地で培養を続けた。

#### (6) GUS活性の調査方法

共存培養処理直後、組織を0.1% Triton X-100を含む0.1 Mリン酸緩衝液(pH6.8)に浸漬し、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。リン酸緩衝液でアグロバクテリウムを洗浄除去した後、0.1 mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-グルコン酸(X-gluc)及び20%メタノールを含むリン酸緩衝液を添加した。37 $^{\circ}$ Cで24時間処理した後、青色の呈色を示す組織を顕微鏡下で観察し、供試組織数に対する百分率で表した。なお、選抜処理後得られた形質転換体と考えられる植物体でのGUS活性の判定に際しては、植物体から葉片を採取し、同様な方法に従ってGUS染色を行った。個体ごとの発現様式で、葉片全体又は葉片の切り口が一樣に青色に呈色するものを陽性個体、キメラ状に呈色するものをキメラ個体とした。

#### (7) 形質転換細胞、組織の選抜

##### (i) 茎頂組織

5日間アグロバクテリウムと共存培養した茎頂組織を250 mg/lセフォタキシム

-15-

を含むN6 S3培地で2週間培養し、生長した茎頂組織を40 mg/lハイグロマイシンを含むN6 S3培地に移して、形質転換体の選抜を行った。

(ii) 胚盤

3日間共存培養した胚盤を250 mg/lセフトキシムを含む2N6培地で1週間培養した後、50 mg/lハイグロマイシンを含む2N6培地で形質転換細胞の選抜を行った。

(iii) 培養組織 (胚盤カルス)

3日間共存培養した培養組織を、250 mg/lセフトキシムを含む2N6培地で1週間培養した後、同培養組織を50 mg/lハイグロマイシンを含む2N6培地で3週間培養してハイグロマイシン抵抗性の培養組織を選抜した(1次選抜)。得られた抵抗性組織をさらに50 mg/lハイグロマイシンを含むN6-12培地(N6無機塩類、N6ビタミン類、2 g/lカザミノ酸、0.2 mg/l 2,4-D、0.5 mg/l 6BA、5 mg/l ABA、30 g/lソルビトール、20 g/lショ糖、2 g/lゲルライト)で2~3週間培養し(2次選抜)、この培地上で増殖したカルスを0、20、50 mg/lハイグロマイシンを含む個体再生用培地N6 S3に移した。なお、共存培養後の培地には全て250 mg/lセフトキシムを添加した。

(iv) 懸濁培養細胞

5日間共存培養した懸濁培養細胞を250 mg/lセフトキシムを含む2N6培地で1週間培養した後、50 mg/lハイグロマイシンを含む2N6培地で形質転換細胞の選抜を行った。

(8) 形質転換次世代における導入遺伝子の発現

形質転換次世代の種子を70 mg/lハイグロマイシンを含む400倍ホーマイ水和剤水溶液中に播種後、25℃で10日間処理し、ハイグロマイシン抵抗性を調査した。また、形質転換次世代の種子を各20粒ずつ播種し、約3週間後の苗から葉片を採取し、GUS遺伝子の発現を調査した。

(9) サザン法による導入遺伝子の分析

品種、朝の光、月の光の形質転換体当代について、小鞠らの方法(Komari et al., 1989; Theoretical and Applied Genetics 77:547-552)に従いDNAを抽出

-16-

し、抽出したDNAに制限酵素HindⅢを処理し、HPT遺伝子をプローブとし、サザン法による導入遺伝子の検出を行った。バイナリープラスミド上のHPT遺伝子を含むHindⅢ断片の長さは、約 5.5 Kb であり、この領域のT-DNAの内部のHindⅢサイトからLボーダー配列の末端までのDNA領域の長さは、約 5.4 Kb である(図1)。なお、サザン法についてはMolecular Cloning (Sambrook et al. 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press)に記載の方法に従って行った。また、“月の光”の形質転換次世代の2系統について、GUS陽性、GUS陰性、ハイグロマイシン抵抗性の各個体を2個体ずつ供試し、同様な手法によりサザン分析を行った。

(10)イネでの供試材料の違いによる遺伝子導入効率(共存培養後におけるGUS発現)

アグロバクテリウムが単子葉作物の細胞に遺伝子を導入することが可能であることを確認するため、強病原性のvir領域を持つアグロバクテリウムEHA101にハイグロマイシン抵抗性遺伝子とGUS遺伝子を持つバイナリーベクターpIG121Hm(上述)を導入した菌をイネ品種月の光の種々の組織に処理し、共存培養後にGUS活性を調査した。供試組織は茎頂、幼根、胚盤、幼根カルス、胚盤カルス及び懸濁培養細胞である。アグロバクテリウムで処理しなかった場合は、いずれの材料でも青色のGUS発現を示すものは認められなかった。一方、アグロバクテリウムEHA101(pIG121Hm)で処理した場合には、幼根を除く組織でGUSの発現が確認された。処理組織数に対する青色を呈する組織の割合では胚盤カルスが最も高かった(表1)。さらに、GUSを発現する組織の大きさでも胚盤カルスが優れていた。胚盤カルスに次いで高い導入率を示した組織は茎頂であった。また、胚盤の脱分化組織である胚盤カルスおよび懸濁培養細胞で高い導入率を示したのに対し、胚盤では明らかに導入効率は低かった。このことは、より細胞分裂の活性が高い組織に遺伝子が導入されやすいことを示唆するものである。

表1 供試材料の違いによるGUS遺伝子の導入効率 (品種: 月の光)

供試組織	GUS+の組織数/処理組織数 (%)		処理組織に対する GUS染色部位の大きさ
	無処理区	処理区	
茎頂	0/ 30 (0)	109/157 (69)	+++
幼根	0/ 20 (0)	0/ 30 (0)	
幼根カルス	0/ 30 (0)	24/115 (21)	+
胚盤	0/ 50 (0)	8/ 89 (9)	+
胚盤カルス	0/141 (0)	312/395 (79)	+++
懸濁培養細胞	0/232 (0)	61/247 (25)	++

+: 1%以下、++: 1~10%、+++: 10%以上

-18-

この実験で使用したバイナリーベクター p I G 1 2 1 H m では G U S 遺伝子のプロモーターの中にヒマのイントロンが挿入されているため、アグロバクテリウムの細胞の中では G U S 遺伝子は発現しないことが確認されている（中村ら、1991）。以上のことから、共存培養後の G U S 遺伝子の発現を指標とした場合、アグロバクテリウムはイネ細胞に遺伝子を導入できることが確認された。

#### （11）供試材料の違いによる形質転換組織および細胞の出現効率

共存培養処理を行った茎頂、胚盤、胚盤カルスおよび懸濁培養細胞を用いて、ハイグロマイシンによる形質転換組織および形質転換細胞の選抜を行った。その結果、胚盤カルスおよび懸濁培養細胞でハイグロマイシンに抵抗性を示す形質転換細胞の増殖が認められた（表2）。また選抜された細胞は、G U S 遺伝子を一樣に発現した。共存培養後、G U S 発現の調査で高い遺伝子導入効率を示した茎頂組織は、ハイグロマイシンによる選抜の結果、全ての組織が枯死し、抵抗性組織は得られなかった。茎頂は生長点を含む組織であるが、遺伝子の導入処理を行った後、抵抗性組織が増殖するためには、遺伝子が限られた生長点に導入される必要がある。アグロバクテリウムとの共存培養処理後、茎頂には多数の遺伝子が導入されているものの抵抗性組織が得られなかったことは、生長点近傍に導入される確率が低いことによると考えられる。また、生長点近傍に遺伝子が導入され形質転換細胞が得られたとしても、得られる植物体がキメラ性を示す可能性が高いことは容易に推測される。これらのことから、Gould et al. (1991) により報告されている茎頂を用いた形質転換方法は、カルスなど脱分化組織を用いる方法に比べ、技術的な困難性が高く、再現性の低い手法であると考えられる。

完熟種子の胚盤に由来する培養組織である胚盤カルスや懸濁培養細胞で形質転換細胞が得られたのに対し、胚盤では抵抗性細胞の増殖は認められなかった。また、Raineri et al. (1990) の方法に従い、傷をつけた胚盤を供試組織として遺伝子導入を試みたが、遺伝子導入効率の向上はみられず、形質転換細胞も得られなかった。これに対し、胚盤カルスを供試組織とした場合には、傷をつけるなどの処理も必要なく、再現性良く、しかも高頻度で形質転換細胞が得られた。これらのことから、アグロバクテリウムによる形質転換の供試組織として、脱分化状態または脱分化過程にある培養組織が好適であると判断される。

-19-

表2 供試材料の違いによる形質転換組織および細胞の出現効率  
(品種：月の光)

供試組織	ハイグロマイシン抵抗性組織数/処理組織数 (%)	
	無処理区	処理区
茎頂	0 / 20 (0)	0 / 77 (0)
胚盤	0 / 30 (0)	0 / 128 (0)
胚盤カルス	0 / 50 (0)	169 / 743 (23)
懸濁培養細胞	0 / 250 (0)	22 / 254 (9)

(12) イネの品種による遺伝子導入効率の違い (共存培養後におけるGUS発現)

培養細胞の確立、培養細胞から個体再生に関しては大きな品種間差異が存在する (Mikami and Kinoshita 1988; Plant Cell Tissue Organ Cult. 12:311-314)。日本稲の中ではコシヒカリは培養が困難とされている。一方、前項で用いた月の光は比較的培養が容易である。アグロバクテリウムによる形質転換法を用いる場合、このような品種間差異があると実用的には不都合である。この点を明らかにするため、コシヒカリと月の光の培養容易性の異なる2品種を用いてアグロバクテリウムによる遺伝子導入効率の差異を調査した。供試組織は胚盤カルスとし、アグロバクテリウムとしてはEHA101 (pIG121Hm) 及びLBA4404 (pIG121Hm) を用いた。

月の光では各実験を通じて90%以上のカルスでGUS活性が認められたが、コシヒカリではこれより低い率でGUS活性が認められた (表3)。従って、EHA101 (pIG121Hm) あるいはLBA4404 (pIG121Hm) を用いた場合には、導入効率に関する品種間差異があるものと解釈される。

表3 アグロバクテリウムの菌系とイネ品種の違いによるGUS遺伝子の導入効率

		GUS+の組織数/処理組織数 (%)		
		菌 系		
品種	実験	LBA4404(pIG121Hm)	EHA101(pIG121Hm)	LBA4404(pTOK232)
月の光	1	67/70 (96)	78/87 (90)	64/66 (97)
月の光	2	72/86 (84)	68/73 (93)	82/82 (100)
コシヒカリ	1	46/135 (34)	43/116 (37)	124/131 (95)
コシヒカリ	2	28/107 (26)	81/143 (57)	102/103 (99)



(13)アグロバクテリウムの菌系による遺伝子導入効率の違い（共存培養後におけるGUS発現）

EHA101 (pIG121Hm) はヘルパープラスミドに強病原性アグロバクテリウムA281のvir領域を持つ。LBA4404 (pIG121Hm) は通常のvir領域を持つ。一方、LBA4404 (pTOK232)はヘルパープラスミドのvir領域は通常型であるが、バイナリーベクターに強病原性アグロバクテリウムA281のvir領域の一部の遺伝子を有する。そして、このバイナリーベクターはpTOK162 から派生したもので、LBA4404 (pTOK162)は双子葉作物の中でも形質転換の困難な植物種に極めて高率で形質転換を可能とした (Saito Y. et al., 1992; Theor. Appl. Genet. 83:679-683)。このように、強病原性のvir領域の存在そのもの、あるいは存在形態は形質転換の効率に大きく影響する可能性がある。そこで、強病原性のvir遺伝子に関して異なる上記の3種類のアグロバクテリウムを用いて、GUS遺伝子の発現に関する導入効率を比較した。なお、供試材料はコシヒカリ、月の光の胚盤カルスである。

強病原性のvir領域を持たないLBA4404 (pIG121Hm) でも両品種ともGUS活性を示す組織が認められたが、コシヒカリではその率は30%程度と低かった。ヘルパープラスミドに強病原性のvirを持つEHA101 (pIG121Hm) ではコシヒカリの導入率はやや上昇した。バイナリーベクターに強病原性のvirを持つLBA4404 (pTOK232)ではコシヒカリでも月の光と同様に95%以上の組織でGUS活性が認められた (表3)。さらに、GUS活性を示すそれぞれの組織での青色領域の面積に関しては、LBA4404 (pTOK232)で最も大きく、高い導入率を示すことが観察された。

(14)菌系の違いによる選抜効率（ハイグロマイシン耐性カルス）

上項と同じ3つの菌系を用いて、月の光、コシヒカリの胚盤カルスとの共存培養後のハイグロマイシン抵抗性カルスの選抜率に関する比較を行った。抵抗性カルスの出現率に関してはLBA4404 (pTOK232)が最も高く、抵抗性カルスの選抜率に関する品種間差異は認められなかった (表4)。LBA4404 (pIG121Hm) あるいはEHA101 (pIG121Hm) の2つの菌系では、選抜率は低く、さらに培養困難なコシヒカリではハイグロマイシン抵抗性カルスの出現は2%程度

-22-

にとどまった。従って、イネの形質転換に用いるアグロバクテリウムとしてはバイナリーベクターに強病原性の *vir* 遺伝子の一部を持つ LBA4404 (pTOK232) が最も優れていると判定される。

表 4 アグロバクテリウムの菌系の違いによる形質転換効率の違い (胚盤カルス)

		ハイグロマイシン抵抗性カルス数/処理カルス数 (%)		
		菌 系		
品種	実験	LBA4404 (pIG121Hm)	EHA101 (pIG121Hm)	LBA4404 (pTOK232)
月の光	1	91/338 (27)	139/301 (46)	169/305 (55)
月の光	2	59/421 (14)	66/425 (16)	110/360 (31)
月の光	3		10/521 (2)	174/644 (27)
月の光	4		20/349 (6)	100/349 (29)
コシヒカリ	1	6/269 (2)		65/283 (23)

-24-

## (15)ハイグロマイシン耐性形質転換体におけるGUS遺伝子の発現様式

このようにして得られた抵抗性カルスをさらに2次選抜にかけ、抵抗性カルスから個体を再生させた。再分化用の培地N6S3にハイグロマイシンを添加した区と無添加の区を設定したが、無添加の場合には、GUS活性がない個体あるいはキメラ状に活性を示す個体が多数出現した。しかし、再分化培地にハイグロマイシンを添加した場合はこのような個体は大幅に減少し、個体全体でGUS活性を示す再生個体が増加した(表5、表6、表7)。なお、アグロバクテリウムで処理しなかった場合には、ハイグロマイシン抵抗性あるいはGUS活性を示す個体は得られなかった。従って、このようなハイグロマイシン抵抗性カルスから再生したGUS活性を全面に示す個体は形質転換体と考えられる。

表5 ハイグロマイシン抵抗性カルスから再分化した植物におけるGUS遺伝子の発現(品種:朝の光)

抵抗性カルス	再分化個体数	GUS遺伝子の発現		
		安定的陽性	キメラ	陰性
1	26	25	1	0
2	8	7	1	0

(固体の再分化まで培地にはハイグロマイシンを添加)

-25-

表 6 ハイグロマイシン抵抗性カルスから再分化した植物における G U S  
遺伝子の発現 (品種: 月の光)

供試菌系	系統数		
	供試ハイグロマイシン抵抗性カルス	植物体再生カルス	再生植物体 G U S 陽性
LBA4404(pIG121Hm)	3	1	1
EHA101(pIG121Hm)	2 0	1 7	1 0
LBA4404(pTOK232)	2 0	1 5	1 2

(個体の再分化まで培地にハイグロマイシンを添加)

表 7 ハイグロマイシン抵抗性カルスから再分化した植物における G U S  
遺伝子の発現 (品種: 朝の光)

供試菌系	系統数		
	供試ハイグロマイシン抵抗性カルス	植物体再生カルス	再生植物体 G U S 陽性
LBA4404(pIG121Hm)	1 9	5	3
EHA101(pIG121Hm)	1 1	4	1
LBA4404(pTOK232)	1 9	1 1	1 1

(個体の再分化まで培地にハイグロマイシンを添加)

## (16) 形質転換体の倍数性および種子稔性

得られた形質転換体は、温室内で栽培することにより正常な生長を示し、外観から4倍体や奇形を示す個体は全く認められなかった。種子稔性についても、一部に部分不稔や完全不稔を示す個体もみられたが、大部分の個体がほぼ正常な稔性を示した。

## (17) 形質転換当代および次世代における導入遺伝子の発現と分析

形質転換体の全DNAをHindIIIで切断したDNA断片に対して、HPT遺伝子をプローブとしたサザン法により形質転換体当代における導入遺伝子の検出を行った。その結果、供試した全ての個体で1～数コピーの導入遺伝子の存在が認められた(表8, 表9)。プラスミドpTOK232の中ではHPT遺伝子を含むHindIII断片は5.5 Kbであるのに対し、供試したすべての形質転換体には、約6 Kb以上のバンドが認められた。このことは、T-DNAが植物染色体へ組み込まれたことを裏付けるものである。なお、検出されたDNA断片の長さが個体で各々異なっていたことは、イネの染色体への遺伝子導入箇所がそれぞれ異なることを示すものであり、植物体内でのバクテリアの残存によるものではないことが確認された。

形質転換次世代個体のハイグロマイシン抵抗性を調査したところ、対照品種の種子では、ほとんど発芽を示さないかもしくは発芽後の生長は著しく阻害された。これに対し、形質転換体から得られた種子の多くは、正常な発芽と生長を示した(表8, 表9)。また、これらのハイグロマイシン抵抗性個体は、GUS遺伝子の発現も認められた。多くの系統ではハイグロマイシン抵抗性、GUS遺伝子の発現ともに1因子分離にほぼ適合する遺伝的分離を示した。表8における”朝の光”の形質転換系統1-2および3-2は、分離比から2因子以上の導入遺伝子の存在が推測されるが、サザン解析の結果も2因子分離に適合していた。表8の2-1の形質転換個体では、2コピーの導入遺伝子の存在を確認したが、このうちの一本のバンドは5 Kbより短い断片であり、T-DNAが不完全な形で組み込まれたものと推測される。従って、この個体は次世代でハイグロマイシン抵抗性について1因子様の分離を示したものと考えられる。

表9では”月の光”の形質転換系統の多くが、次世代でハイグロマイシン抵抗

-27-

性およびGUS遺伝子の発現について1因子様の分離を示した。しかし、当代のサザン分析では一部の個体が1コピーであったほかは、複数のコピー数を示した。形質転換当代のサザン分析により、導入遺伝子が1コピーであった18aおよび2コピーであった16cの次世代2系統について、GUS陽性、GUS陰性、ハイグロマイシン抵抗性の各個体を2個体ずつ供試し、サザン分析を行った。その結果、GUS陰性の個体を除くすべての個体で、形質転換当代の個体と同一のバンドが検出され、導入遺伝子が形質転換次世代に遺伝していることが示された。2コピーの導入遺伝子を持つ系統16cについても、GUS陽性およびハイグロマイシン抵抗性の各次世代個体で、いずれも同一な2コピーの導入遺伝子を有していたことは、同一の染色体または遺伝子座に複数の遺伝子が組み込まれたことを示唆するものである。

これらの結果は、アグロバクテリウムによりイネに導入された遺伝子が、植物細胞の核に組み込まれ、メンデルの法則に従って、後代に遺伝したことを示すものである。

表 8 サザン解析による形質転換体における導入遺伝子のコピー数および  
形質転換次世代における導入遺伝子の発現（品種：朝の光）

形質転換個体	導入遺伝子 コピー数	次世代個体数			
		ハイグロマイシン抵抗性		GUS発現	
		抵抗性	感受性	陽性	陰性
対 照	—	0	60	0	20
1-2	2	30	0	19	1
2-1	2*	64	26	13	5
3-2	2	59	1	19	1

\* 2 コピーの導入遺伝子のうち 1 つは制限断片が短く、導入遺伝子は不完全



-29-

表 9 サザン解析による形質転換体における導入遺伝子のコピー数および  
形質転換次世代における導入遺伝子の発現（品種：月の光）

形質転換個体	導入遺伝子 コピー数	次世代個体数			
		ハイグロマイシン抵抗性		GUS発現	
		抵抗性	感受性	陽性	陰性
対 照	—	0	60	0	20
1	1	46	26	15	5
2 a	2	33	18	13	5
2 b	2	31	9	15	5
3	2	29	10	16	3
4 a	3	22	21	13	7
4 b	3	48	11	16	3
5 a	3	26	13	17	3
5 b	3	36	14	17	3
5 c	3	24	9	17	2
6	2	47	13	—	—
7	1	56	20	14	5
8	4	45	22	—	—
9	1	52	18	18	2
10	4	53	10	—	—
11	2	75	15	18	2
12	3	44	7	14	6
13 a	2	33	18	15	5
13 b	2	32	8	13	7

表 9 (続き)

形質転換個体	導入遺伝子 コピー数	次世代個体数			
		ハイグロマイシン抵抗性		GUS発現	
		抵抗性	感受性	陽性	陰性
14 a	1	72	20	15	5
14 b	1	26	14	10	10
15	1~2	22	7	12	8
16 a	2	31	10	15	2
16 b	2	32	8	14	3
16 c *	2	69	24	13	7
17	6	89	41	—	—
18 a *	1	35	5	15	5
18 b	1	70	20	10	10
19	2	47	13	—	—

\*次世代についてサザン法による導入遺伝子の分析を行った。

## 実施例 2

### (1) トウモロコシ品種

トウモロコシ品種A188, F1 (A188 x Black Mexican Sweet), F1 (A188 x B73Ht), F1 (B73Ht x A188), F1 P3732 を材料として選定した。A188, Black Mexican Sweet, B73Htのいずれの各品種は農林水産省生物資源研究所から、また、P3732 は磐田酪農協同組合から各々入手した。

### (2) 生長点近傍組織の調製

完熟種子を70% エタノールに1分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに5分間浸漬した。滅菌水で3回洗浄後、LS固体培地 (Linsmaier and Skoog の無機塩およびビタ

-31-

ミン類; Linsmaier, E. and Skoog, F. 1965; *Physiol. Plant* 18: 100-127, 10 mg/l カザミノ酸、700 mg/l プロリン、20 g/l ショ糖、2.3 g/l ゲルライト) に置床した。25℃、暗黒下で4日間培養後、発芽した幼苗から頂端分裂組織を含む約0.1 x 0.3 mmの組織を切り出し以下の実験に供試した。

### (3) 未熟胚由来カルスの調整

未熟胚を L S D 1. 5 固体培地 (Linsmaier and Skoog の無機塩およびビタミン類、100mg/l カザミノ酸、700mg/l プロリン、1.5mg/l 2,4-D、20g/l ショ糖、2.3g/l ゲルライト) に置床した。3週間培養後、形成された胚盤由来カルスを以下の実験に供試した。

### (4) アグロバクテリウムの菌系

実施例1に示したアグロバクテリウムの菌系のうち、LBA4404 (pTOK232) および EH A101 (pIG121Hm) を用いた。

### (5) アグロバクテリウム懸濁液の調整

ハイグロマイシン (50 mg/l) とカナマイシン (50 mg/l) を含む A B 培地上で3~10日間培養したアグロバクテリウムのコロニーを白金耳でかきとり、実施例1に示した修正 A A 培地に懸濁し、菌濃度を  $3 \sim 5 \times 10^9$  細胞/ml に調整し接種に用いた。

### (6) 生長点近傍組織への接種、培養条件

切り出した組織をガラス針で穿刺後、上述のアグロバクテリウム懸濁液に3~10分間浸漬した。浸漬処理後、100  $\mu$ M アセトシリゴン、20 g/l ショ糖、10 g/l グルコースを含む修正 L S 固体培地 (Linsmaier and Skoog の無機塩類、Murashige and Skoog のビタミン類; Murashige, T. and Skoog, F. 1962; *Physiol. Plant.* 15:473-497, 0.1 mg/l カイネチン、1.0 mg/l カザミノ酸、2.3 g/l ゲルライト) に移植し、25℃、照明下で2~3日間培養した。その後、250 mg/l セフトキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフトキシムを含む L S 固体培地で培養を続けた。

### (7) カルスへの接種、培養条件

カルスを前述のアグロバクテリウム懸濁液に約5分間浸漬後、実施例1に示したアセトシリゴンを含む 2 N 6 固体培地に移植し、25℃、暗黒下で3日間共存

-32-

培養をおこなった。その後カルスを250mg/l セフトキシムを含む滅菌水で洗浄し、同濃度のセフトキシムおよび30mg/lハイグロマイシンを含むLSD 1.5 固体培地で培養を続け、形質転換カルスの選抜を行った。

#### (8) GUS活性の調査方法

共存培養処理直後の茎頂組織およびカルス、その後培養を継続した茎頂組織およびカルスについて実施例1の方法にもとづきGUS活性を調査した。

#### (9) 茎頂組織への遺伝子導入

Gould らの報告 (Gould J., et al. 1991; Plant Physiol. 95:426-434) による生長点組織 (茎頂組織) を材料とした形質転換が可能である事を確認するため、前述のアグロバクテリウム菌系EHA101(pIG121Hm)を単離した茎頂組織に処理し、生長した植物体でのGUS活性を調査した。アグロバクテリウム非処理の組織では、いずれもGUS遺伝子の発現はみられなかったが、アグロバクテリウム処理した組織では針で穿刺した部分にGUS遺伝子の発現が小さな点状に認められた。しかし、その後培養を続けた植物体でGUS活性を調査したところ、GUS遺伝子の発現を示すものは全くなかった。生長点近傍は非常に微細な組織であり、そこに穿刺しアグロバクテリウムを感染させることは容易でない。本実験の結果から生長点近傍へのアグロバクテリウムによる形質転換には生長点の切り出し、穿刺などに熟練した技術が必要であると考えられた。

表 10 トウモロコシ茎頂組織への遺伝子導入

実験	供試 組織数	茎頂の伸長した 組織数	得られた 植物体数	GUS 発現のみられた 植物体数
1	24	9	2	0
2	16	8	6	0
3	17	13	5	0
4	14	1	0	0
5	45	14	7	0
6	32	14	8	0
7	30	7	1	0

供試品種はいずれも P 3 7 3 2

(10) トウモロコシの品種および供試菌系による遺伝子導入効率の違い  
 供試したいずれの品種でも高頻度で GUS 遺伝子の発現がみられた。EHA101 (pIG121Hm)、LBA4404 (pTOK232) の菌系間での遺伝子発現効率の差は認められなかった (表 10)。処理カルスに対する GUS 染色部位の大きさも 10% 以上のものが多く、広範囲の細胞で遺伝子発現が示された。供試したアグロバクテリウムのバイナリベクター pIG121Hm および pTOK232 は GUS 遺伝子中にヒマのイントロンが介在しているため、アグロバクテリウムの細胞の中では GUS 遺伝子を発現しない。このことから、トウモロコシのカルスにおいて認められた GUS 遺伝子の発現は、アグロバクテリウムにより高頻度で遺伝子導入が行われたことを示すものである。共存培養後、ハイグロマイシンを含む固体培地上で培養することにより、供試カルスの一部でコンパクトでこぶ状のカルスが増殖した。増殖した細胞は GUS 遺伝子の発現を示したことから、形質転換細胞であると考えられる。これらのコンパクトでこぶ状の形質転換カルスは Lupotto らの方法 (Lupotto, E. and Lusardi, M. C. 1988; Maydica XXXIII:163-17

-34-

7) により再分化可能である。

表 1 1 トウモロコシカルスへの G U S 遺伝子の導入効率

品種	菌株	GUS+ のカルス数 / 処理カルス数 (%)
A188	1	32/35 (91)
A188	1	34/34 (100)
A188×BMS	1	41/49 (84)
A188×B73	1	35/42 (83)
A188	2	39/40 (98)
A188	2	40/40 (100)
A188×BMS	2	38/40 (95)
A188×B73	2	31/40 (78)
B73 ×A188	2	29/35 (83)

BMS: Black Mexican Sweet

菌系 1:EHA101(pIG121Hm), 2:LBA4404(pTOK232)

-35-  
請求の範囲

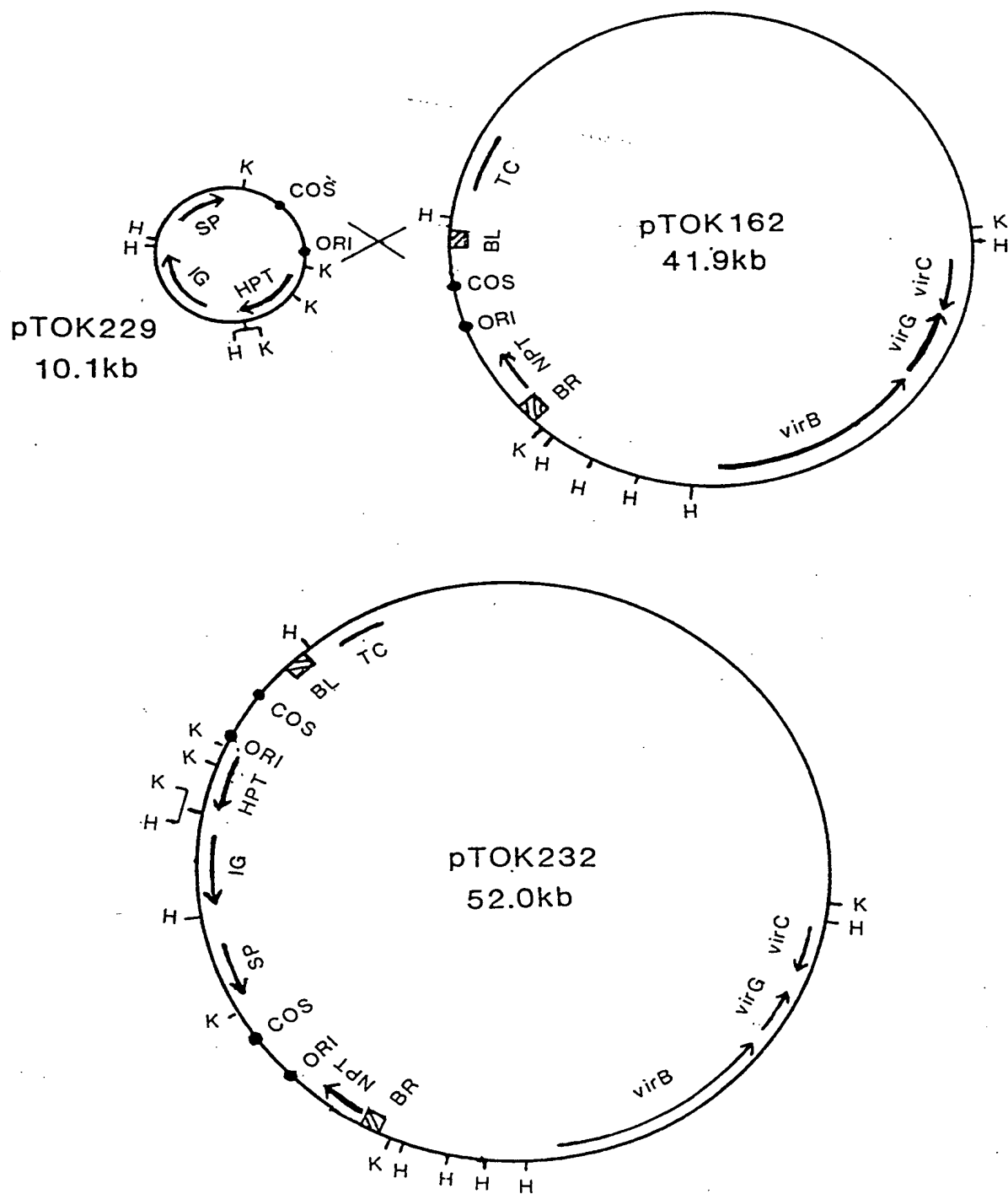
1. 所望の遺伝子を含むアグロバクテリウム属細菌で単子葉植物の脱分化過程にある培養組織又は脱分化した培養組織を形質転換することから成る単子葉植物の形質転換方法。
2. 前記単子葉植物がイネ科植物である請求項1記載の方法。
3. 前記単子葉植物がイネである請求項1記載の方法。
4. 前記の単子葉植物がトウモロコシである請求項1記載の方法。
5. 前記アグロバクテリウム属細菌は、TiまたはRiプラスミドを持つアグロバクテリウム属細菌であって、*Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミド pTiBo542 のヴィルレンス領域由来のDNA断片を含むプラスミドを導入したアグロバクテリウム属細菌である請求項1ないし4いずれか1項に記載の方法。
6. 前記DNA断片を含むプラスミドはpTOK162 又はその誘導体である請求項5記載の方法。
7. 前記アグロバクテリウム属細菌は、*Agrobacterium tumefaciens* である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。
8. 形質転換操作に用いるアグロバクテリウム属細菌の菌濃度が $10^6 \sim 10^{11}$ 細胞/mlである請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
9. 前記の培養組織を酵素処理や傷つけるなどの前処理を行わず形質転換に供する請求項1ないし8のいずれか1項に記載の方法。
10. 前記の培養組織を形質転換に供試した後、脱分化過程または脱分化状態で形質転換細胞または形質転換組織を選抜する請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。
11. 前記脱分化過程にある培養組織は、外植片を脱分化誘導培地に置床後7日以上のカルス形成過程にある培養組織である請求項1ないし9のいずれか1項に記載の方法。
12. 前記培養組織が単子葉植物の体細胞由来の培養組織である請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。
13. 培養組織が正常な個体を再生する能力を有する組織である請求項1ない

WO 94/00977

PCT/JP93/00925

し 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。 -36-





国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP

93/00925

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>3</sup> A01H1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>3</sup> A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICST 科学技術文献ファイル BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	D. M. Raineri et. al., Biotechnology, Vol. 8, No. 1, p. 33-38 (1990)	1-13
Y	E. Jarchow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, p. 10426-10430 (1991)	1-13
Y	BIO INDUSTRY, Vol. 8, No. 6, p. 365-373 (1991), 特に p. 371 左欄参照	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.09.93

国際調査報告の発送日

28.09.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

郡山

順

2 B 8 5 0 2

電話番号 03-3581-1101 内線

3236

国際特許報告

国際出願番号

CT/JP

93/00925

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Vito S. Polito et. al. , Plant Cell Reports , Vol. 8 , No. 4 , p. 219-221	1-13